

Université de Montréal

**Essai d'amélioration du taux de rétention de la  
tétracycline dans un polymère à empreinte moléculaire  
formé de co-polymères fonctionnalisés de l'acide lactique**

Par

Hazar Ziadi

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté de pharmacie

En vue de l'obtention du grade de maître

En sciences pharmaceutiques

Option chimie médicinale

08, 2010

© Hazar Ziadi, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Essai d'amélioration du taux de rétention de la  
tétracycline dans un polymère à empreinte moléculaire  
formé de co-polymères fonctionnalisés de l'acide lactique**

Présenté par :  
Hazar Ziadi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jérôme Del Castillo, président-rapporteur  
Patrice Hildgen, directeur de recherche  
Julie Roy, membre du jury

## Résumé

Le vétérinaire aide le producteur laitier à garder son troupeau en santé. Lorsqu'une vache est malade, il peut prescrire des antibiotiques. Le cas échéant, le lait de la vache traitée aux antibiotiques est jeté. Il n'est donc pas vendu pour consommation. Tout le lait produit est analysé avant d'être pasteurisé et transformé afin de s'assurer que les produits laitiers ne contiennent pas de résidus d'antibiotiques. Si les analyses indiquent que le lait renferme des traces d'antibiotiques, il est jeté et le producteur en cause doit assumer la perte.

Les épreuves de dépistage actuelles de ces résidus médicamenteux sont onéreuses et inapplicables sur le terrain. Pour résoudre cette problématique aux pieds de la vache, la solution proposée dans ce projet est la fabrication d'un kit de détection basé sur les polymères à empreinte moléculaire. Il s'agit de polymères dont la conformation moléculaire est complémentaire à celle des antibiotiques.

Dans ce projet, il est question d'améliorer l'efficacité des épreuves de dépistages des résidus de tétracyclines en augmentant le nombre de sites d'interaction entre l'antibiotique et des polyesters. Trois polymères sont utilisés portant respectivement des groupements aromatiques, carboxyliques et hydroxyles.

Une étude antérieure dans notre laboratoire avait déjà donné un pourcentage de rétention de tétracycline de 50% pour une composition de 1/3 PLAOH- 1/3 PLACOOH- 1/3 PLAObn. Avec des ajustements, le pourcentage passe à 38.93 % pour une composition de 1/4 PLAOH- 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAOPh, de 44.81 % pour une composition de 1/4 PLACOOH- 1/2 PLAOH- 1/4 PLAOPh, de 66.34 % pour une composition de 1/4 PLAOH- 1/4 PLACOOH- 1/2 PLAOPh et de 78.07 % pour une composition de 1/6 PLAOH- 1/6 PLACOOH- 2/3 PLAOPh. Notre hypothèse était que la présence accrue du groupement phényle augmenterait le nombre de sites d'interaction spécifique avec l'antibiotique

augmentant ainsi le pourcentage de rétention de l'antibiotique à travers les MIP. Les résultats ont confirmé cette hypothèse.

**Mots-clés** : tétracycline, PLA, polymère à empreinte moléculaire

## Abstract

The veterinarian is helping the dairy farmer to keep his flock healthy. When a cow is sick, he may prescribe antibiotics. But in that case, the cow milk treated with antibiotics is discarded, and not sold for consumption. All milk products are analyzed before being pasteurized and processed to ensure that dairy products do not contain residues of antibiotics.

If the analyses show that milk contains traces of antibiotics, it is discarded and the producer must bear the loss.

On place, the current screening tests for drug residues are expensive and inapplicable. To resolve this problem at the feet of the cow, the solution proposed in this project is the production of a detection kit based on molecular imprinted polymers. These are polymers whose molecular conformation is complementary to that of antibiotics.

This project is about improving the effectiveness of screening tests for residues of tetracyclines by increasing the number of interaction sites between the antibiotic and polyester. Three polymers are used respectively, aromatic, carboxyl and hydroxyl groups.

A previous study in our laboratory had already shown a tetracycline retention percentage of 50% for a composition of 1 / 3 PLAOH-1 / 3 PLACOOH-1 / 3 PLAObn. After variation in the polymers ratio, the percentage obtained is, 38.93 % for a composition of 1 / 4 PLAOH-1 / 2 PLACOOH-1 / 4 PLAOPh, 44.81 % for a composition of 1 / 4 PLACOOH- 1 / 2 PLAOH- 1 / 4 PLAOPh, 66.34 % for a composition of 1/4 PLAOH- 1/4 PLACOOH- 1/4 PLAOPh and 78.07 % for a composition of 1/6 PLAOH- 1 / 6 PLACOOH- 2 / 3 PLAPh.

Our hypothesis was that the increase of the amount of the phenyl group, increases the number of specific interaction sites with the antibiotic, and so increases the percentage of retention of the antibiotic through the MIP. The results confirmed this hypothesis.

**Keywords:** tetracycline, PLA, molecular imprinted polymer

## Table des matières

Introduction.....	1
I. Les antibiotiques .....	1
I.1. Définition .....	1
I.2. Les différentes classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'actions.....	2
I.3. Les tétracyclines .....	5
I.4. Consommation accrue d'antibiotiques.....	7
I.4.1. Consommation d'antibiotiques dans le monde .....	7
I.4.2. Consommation au Canada .....	10
I.5. Résidus d'antibiotiques dans le lait .....	11
I.6. La résistance aux antibiotiques et son évolution .....	13
I.7. Méthodes de détections des antibiotiques : avantages et inconvénients .....	16
II. Polymères à empreintes moléculaires et détections d'antibiotiques.....	26
II.1. Polymères à empreinte moléculaire .....	26
II.2. Caractéristiques des MIP .....	28
III. Les polylactides .....	32
IV. Le projet .....	34
IV.1. Les hypothèses de notre travail.....	34
IV.2. Les objectifs .....	34
Matériels et méthodes .....	36
I Synthèses et fabrication des polymères .....	36
I.1. Protocole de synthèse .....	37
I.1.1 Synthèse de PLA-allyle : Réaction de polymérisation du 3,6-diméthyl-1,4-dioxane-2,5-dione en PLA-allyl.....	37
I.1.2 Synthèse de PLA-OH : hydroboration d'un alcène.....	38
I.1.3 Synthèse de PLA-COOH : Réaction de Jones.....	39

I.1.4	Synthèse de PLAPh.....	40
II	Synthèse des MIP de PLA.....	41
II.1.	Préparation des MIP.....	41
II.2.	Le lavage des MIP .....	42
II.3.	La recapture .....	43
II.4.	La quantification de la tétracycline capturée par l’empreinte.....	43
III	NIP de PLA .....	43
IV	Appareillages.....	43
IV.1.	RMN 1H (Résonance Magnétique Nucléaire).....	43
IV.2.	HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance) .....	44
IV.3.	GPC (Gel Permeation Chromatography).....	44
IV.4.	DSC (Differential Scanning Calorimetry) .....	44
Résultats et discussions.....		46
I.	Analyses par RMN de proton.....	46
II.	Analyses par GPC.....	48
III.	Analyses par DSC.....	49
IV.	Courbe de calibration (pour la quantification de la tétracycline par HPLC).....	53
V.	Dosage par HPLC-UV .....	54
VI.	Comparaison entre NIP et MIP de tétracycline.....	62
Conclusion .....		65
Bibliographie .....		67



## Liste des tableaux

Tableau 1: Consommation d'antibiotiques au Royaume-Uni en 2000 .....	9
Tableau 2: Consommation d'antibiotiques au Kenya entre 1995 et 1999 .....	10
Tableau 3: Valeurs de MRL d'antibiotiques dans le lait donnés par la FDA et la fondation de recherche alimentaire et chimique du Japon .....	23
Tableau 4: Limites maximales de résidus selon l'Union Européenne .....	24
Tableau 5: Maximum de résidu de sulfonamides et quinolones dans le lait de vache .....	25
Tableau 6: Liste de quelques applications des polymères à empreintes moléculaires.....	27
Tableau 7: Les caractéristiques des polymères à empreintes moléculaires .....	30
Tableau 8: Analyse par GPC de PLA <sub>OH</sub> , et du PLACOOH .....	48

## Liste des figures

Figure 1 : Structures chimiques de quelques classes d'antibiotiques .....	4
Figure 2: Structure chimique de la tétracycline et de l'oxytétracycline; mode d'action de la tétracycline. ....	6
Figure 3: Pourcentage d'usage d'antibiotiques aux États-Unis en 1999 .....	7
Figure 4: Les différents mécanismes de résistances.....	15
Figure 5: Chromatogramme HPLC de solutions standards de tétracycline à : 0,5, 3 et 5 µg/l .....	17
Figure 6: Limite de détection par le test Copan et le test Delvo (en ng/ml).....	18
Figure 7: Comparaison des différents tests utilisés pour détection d'antibiotiques chez des brebis traités aux antibiotiques.....	19
Figure 8: Comparaison qualitative entre la méthode HPLC et les tests biologiques .....	20
Figure 9: Augmentation du nombre de publication concernant les MIP .....	26
Figure 10: Structure tridimensionnel d'un MIP .....	28
Figure 11: Approche covalente et non-covalente.....	31
Figure 12: Structure chimique du polylactide .....	33
Figure 13 : Schéma de synthèse des polymères PLA-allyle, PLA <sub>OH</sub> , PLACOOH .....	36
Figure 14: synthèse de PLA-allyl.....	37
Figure 15: Synthèse de PLA <sub>OH</sub> .....	38
Figure 16: Synthèse de PLACOOH .....	39
Figure 17: Synthèse de PLAPh.....	41
Figure 18: Spectre <sup>1</sup> H RMN de : a)PLA <sub>OH</sub> , b) PLACOOH, c) PLAPh .....	47
Figure 19: Thermogrammes représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C de : a) PLA <sub>OH</sub> seul, b) PLACOOH seul, c) PLAPh seul.....	50
Figure 20: Thermogramme d'un mélange physique de 1/3 PLACOH- 1/3 PLACOOH- 1/3 PLAPh.....	51

Figure 21: Thermogrammes représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C des mélanges de NIP de compositions : a) 1/4 PLA <sub>OH</sub> - 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAPh, b) 1/4 PLACOOH- 1/2 PLA <sub>OH</sub> - 1/4PLAPh, c) 1/4 PLA <sub>OH</sub> - 1/4 PLACOOH- 1/2 PLAPh, d) 1/6 PLA <sub>OH</sub> - 1/6 PLACOOH- 2/3 PLAPh.....	52
Figure 22: Courbe de calibration de tétracycline en µg/l.....	53
Figure 23: Schéma représentant l'intensité en fonction du temps pour une solution de tétracycline de concentration 1 µg/ml.....	54
Figure 24: Schéma de dégradation de la tétracycline au 4-épitétracycline.....	55
Figure 25 : Schémas représentant l'intensité en fonction du temps de TC pour les quatre lots de MIP de composition : a) 1/2 PLA <sub>OH</sub> - 1/4 PLACOOH- 1/4 PLAPh, b) 1/4 PLA <sub>OH</sub> - 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAPh, c) 1/4 PLA <sub>OH</sub> - 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAPh et d) 1/6 PLA <sub>OH</sub> - 1/6 PLACOOH- 2/3 PLAPh après une incubation de 24 h.....	56
Figure 26 : Schémas représentant l'intensité en fonction du temps de TC pour les quatre lots de NIP de compositions : a) 1/2 PLA <sub>OH</sub> - 1/4 PLACOOH- 1/4 PLAPh, b) 1/4 PLA <sub>OH</sub> - 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAPh, c) 1/4 PLA <sub>OH</sub> - 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAPh et d) 1/6 PLA <sub>OH</sub> - 1/6 PLACOOH- 2/3 PLAPh après une incubation de 24 h.....	58
Figure 27: Mécanisme des liaisons entre l'antibiotique et le PLA <sub>OH</sub> - PLACOOH- PLAPh .....	61
Figure 28: Illustration du nuage polymérique attendu pour la tétracycline .....	61
Figure 29: Comparaison entre les aires des pics de tétracyclines obtenues avec les MIP (série 2), et les NIP (série1).....	62
Figure 30 : la libération de tétracycline à travers les MIP et non-MIP .....	63

## Liste des abréviations

AFSSA: Agence Française de Sécurité Sanitaire

AND: Acide Désoxyribonucléique

BH<sub>3</sub>: Tri Hydroborane

BRT: Brucella Ring Test

CEC: Electrochromatographie

COOH: Carboxyle

CPL: Chromatographie en Phase Liquide

DJA: Dose Journalière Admissible

DSC: Differential Scanning Calorimetry

EC: Electrophorèse Capillaire

FAO: Food and Agriculture Organization

FDA: Food and Drug Administration

GPC: Gel Permeation Chromatography

HF: Tétra Hydrofurane

HPLC: Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance

LMR : Limites Maximales de Résidus

MIP : Polymère à empreinte moléculaire

MOPH: Ministry Of Public Health

Na: Sodium

NARMS: National Antimicrobial Resistance Monitoring System

NIP : Polymère non imprimé

OH: Hydroxyle

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PLA : Acide polylactide

Ph: Phényle

Rosa : Rapid One Step Assay

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

RNA: Acide Ribonucléique

Sn : Étain

SPE: Extraction Solide-Liquide

SVARM: Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System

TC: Tétracycline

UE: Union-Européenne

US: United-State

## **Dédicace**

*Je dédie ce travail...*

*A mes parents HAMIDA et SABIHA,*

Pour m'avoir toujours soutenu et cru en moi, même quand moi-même j'avais du mal à le faire. Aucun mot ne saurait exprimer la profondeur de l'amour que j'éprouve pour vous.

Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait et que vous faites encore pour moi et je vous dédie ce mémoire pour vous dire que je vous aime énormément.

Que Dieu vous protège.

*A mon très cher enfant ADAM CHAHINE,*

Depuis ta naissance, tu as envahi ma vie. J'espère que tu seras toujours fier de ta maman.

Puisse Dieu t'offrir santé, succès et tout le bonheur du monde mon dadouchti.

*A ma grande sœur Wafa,*

Qui depuis mon arrivée à Montréal n'a pas arrêté de me soutenir moralement et financièrement, merci grande sœur.

*A mon adorable petit frère jaleddine, sa femme Dorra et ma sœurlette Mahouta, mes nièces Nour, May Salima et Firyel,*

Nos souvenirs d'enfances me manquent beaucoup, et vivre entre vous est aujourd'hui un rêve.

*A mon très cher ami et époux Iheb Bellasfar,*

Pour toute ta patience, ta compréhension, ta présence, ton soutien, ton amour... Sans toi, je n'aurais jamais eu la force de finir ce travail. Je te le dédie en témoignage de ma profonde reconnaissance et mon grand amour. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu fais pour notre enfant et moi, merci chéri.

J'espère que tu seras toujours à nos côtés pour donner un sens à tout ce qu'on fait.

Que Dieu veille sur toi, exhausse tes prières, protège notre enfant et notre amour et nous aide à dépasser les moments difficiles de notre vie.

Je t'aime beaucoup.

*A mamati Majida, mes oncles, mes tantes et Khalti,*

*A l'âme de mes grands-parents et ma tante,*

*A toute ma famille Ziadi et Khayati*

*A mes beaux parents : HABIB et NABIHA,*

*A tous mes amis*

*A tous ceux qui m'aiment....*



## Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement:

*Mon directeur de recherche Patrice HILDGEN,*

Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre encadrement, veuillez trouver dans ce travail, le témoignage de ma reconnaissance et mon estime.

*Tous mes collègues de travail.*

# Introduction

## I. Les antibiotiques

Les antibiotiques, sont des médicaments d'utilisation courante en médecine, ils sont cependant de découverte récente et ont permis de sauver de nombreuses vies. En 1897, Ernest Duchesne met en évidence les propriétés de certaines moisissures (*Penicillium glaucum*), mais ce n'est qu'en 1928 qu'Alexandre Fleming découvre "officiellement" la pénicilline, et ce n'est qu'en 1943, qu'elle sera produite industriellement. Depuis, le développement de nouveaux antibiotiques est devenu un pôle important de la recherche médicale.

Les antibiotiques sont définis par leur :

- Activité antibactérienne (spectre d'activité),
- Toxicité sélective (mode d'action),
- Activité en milieu organique (pharmacologie),
- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme. (pharmacocinétique)

### I.1. Définition

Le mot antibiotique provient de deux termes Grec anti : contre, et bios : la vie. Les antibiotiques sont des substances chimiques qui ont une action spécifique avec un pouvoir destructeur sur les micro-organismes. Ils sont dépourvus de toxicité pour les autres cellules, ces molécules peuvent avoir une action bactéricide, ou fongicide, leur efficacité peut être également limitée à empêcher le développement des micro-organismes (bactériostatiques ou fongistatiques).

Un antibiotique est donc un médicament qui a pour effet de tuer des bactéries de façon ciblée. Il se distingue d'un antiseptique qui détruit tout germe et parfois même la cellule, de manière non ciblée [1].

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, le spectre d'action, le mécanisme d'action, la classification la plus utile et la plus utilisée est basée sur la structure chimique.

## **I.2. Les différentes classes d'antibiotiques et leurs mécanismes d'actions**

Les antibiotiques les plus couramment utilisés chez les animaux destinés à l'alimentation peuvent être regroupés en sept classes (Figure 1) : les bêta-lactamines (ex.: la pénicilline et la céphalosporine), les tétracyclines (ex.: l'oxytétracycline, la tétracycline et la chlortétracycline), les aminoglycosides (ex.: la streptomycine et la gentamicine) [2], les macrolides (ex.: l'érythromycine), les sulfamides [3] (ex.: la sulfaméthazine), les phénicoles et les quinolones [4].

Ainsi on trouve [1] [5]:

**Les bêta-lactamines :** Le noyau de base est le cycle bêta-lactame. Les antibiotiques de cette famille sont des bactéricides.

Les bêta-lactamines agissent au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane entraînant une lyse bactérienne.

**Les aminosides ou aminoglycosides :** Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Ce sont des antibiotiques rapidement bactéricides.

Ils perturbent la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome entraînant la destruction bactérienne.

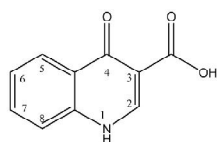
**Les phénicoles :** On trouve, le thiamphénicole, le florfénicole, et le chloramphénicole.

Se sont des bactériostatiques, ils agissent au niveau de la sous unité 50 S du ribosome, et ceci a pour conséquence une inhibition de la synthèse des protéines.

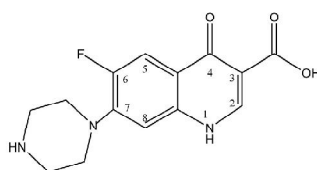
**Les quinolones :** Les quinolones [3, 6] ont une structure générale dérivant de l'acide dihydro-1,4 oxo-4-quinoléine carboxylique. Les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gyrase" en empêchant la réplication et la transcription de l'ADN bactérien [7].

**Les sulfonamides :** Ils sont constitués d'un noyau paraminobenzène sulfonamide avec un radical R. Ils ont une activité bactériostatique. Ils bloquent l'action de la synthétase [6, 8-11].

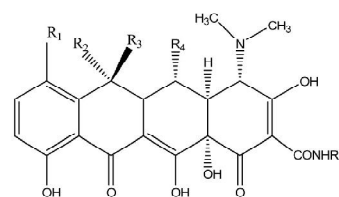
**Les macrolides :** Les macrolides sont des macrolactones qui agissent en inhibant la synthèse protéique bactérienne. Ils se fixent sur l'unité 50 S du ribosome et bloquent ainsi la réunion du dernier stade de la synthèse. Ils sont des bactériostatiques [12].



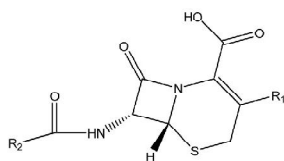
Quinolones



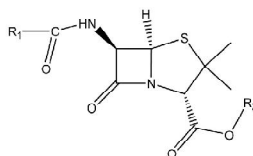
Fluoroquinolones



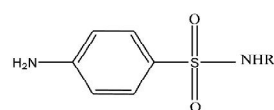
Tetracyclines



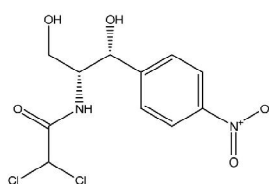
Cephalosporins



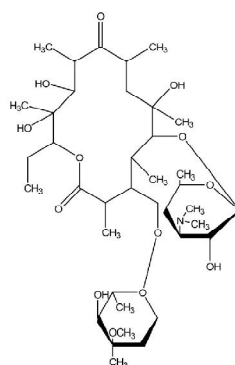
Penicillins



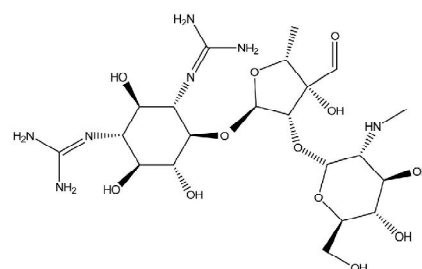
Sulphonamides



Chloramphenicol



Erythromycin



Streptomycin

«Source : [1]»

Figure 1 : Structures chimiques de quelques classes d'antibiotiques

Dans ce travail et parmi ces antibiotiques on a choisi de s'intéresser à la classe des tétracyclines et en particulier à la chlortétracycline.

### I.3. Les tétracyclines

Comme leur nom l'indique, les tétracyclines (TC) possèdent une structure chimique commune composée de quatre cycles hexacarbonés fusionnés en ligne, elles ont été découvertes pour la première fois en 1945 [13], et depuis elles sont utilisées dans le contrôle des infections bactériennes chez les animaux et chez les humains [14]. Les tétracyclines sont utilisées de façon importante depuis les années 50, les mécanismes responsables de leur action inhibitrice ne sont pas entièrement connus. Cependant, il semble établi qu'une fois dans le cytoplasme, elles inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la structure cible, un site localisé sur la sous-unité 30S des ribosomes pour lequel elles présentent une grande affinité. Elles perturbent ainsi l'interaction codon-anticodon entre l'ARNt et l'ARNm ce qui bloque la phase d'élongation, c'est-à-dire l'attachement du complexe ARNt – Acide Aminé au site unique du ribosome. Les tétracyclines agissent donc au stade de la traduction protéique (Figure 2) [15].

Les tétracyclines sont des agents à large spectre [16], couvrant des bactéries à Gram-positive et d'autres à Gram-négative, tels que les atypiques *Chlamydiae*, les mycoplasmes, les rickettsies, les parasites et les protozoaires.

Les tétracyclines sont des amphotères pouvant former des sels avec des acides ou des bases, cette propriété permet d'améliorer de façon importante leur solubilité dans l'eau en vue d'une administration par voie intraveineuse. Elles peuvent également former des chélates avec des cations (tels que  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ ), ce qui risque de diminuer l'absorption digestive ou d'entraîner la formation de précipités insolubles avec des solutés pour perfusion [15].

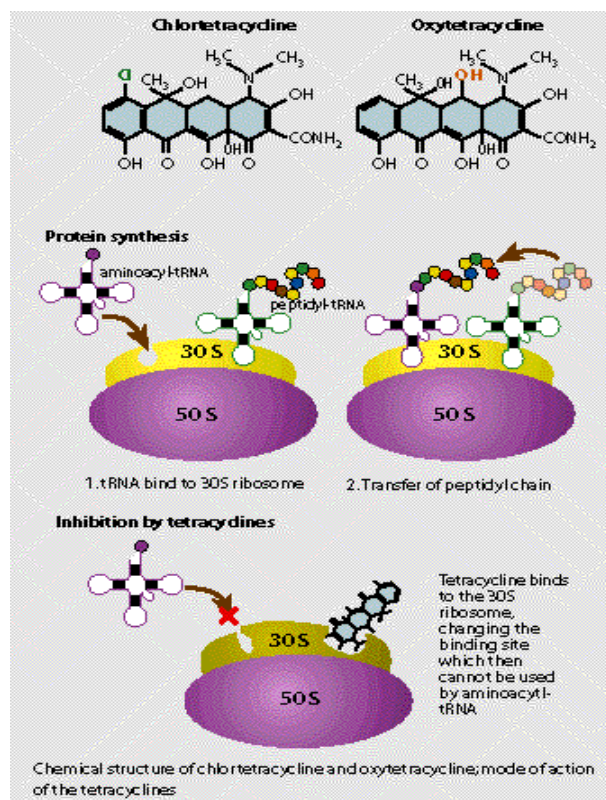
On distingue des cyclines naturelles et les cyclines hémi-synthétiques.

### Cyclines naturelles

- Chlortétracycline
- Tétracycline

### Cyclines hémi-synthétiques

- Oxytétracycline
- Doxycycline
- Minocycline



«Source : [15]»

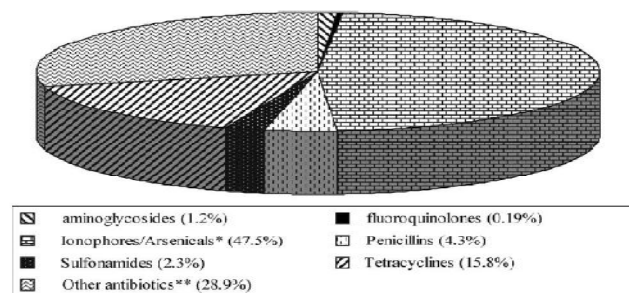
Figure 2: Structure chimique de la tétracycline et de l'oxytétracycline; mode d'action de la tétracycline.

## I.4. Consommation accrue d'antibiotiques

De nos jours, les antibiotiques sont considérés comme les plus importants des composés bioactifs produits par synthèse microbiologique. Ils sont largement utilisés pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies mais aussi comme promoteurs de croissance chez les animaux [17]. Plus de 40 000 composés ont été découverts dont 80 sont utilisés dans l'agriculture [18].

### I.4.1. Consommation d'antibiotiques dans le monde

Aux États-Unis, plus de 16 millions de kg de composés antimicrobiens sont utilisés chaque année, dont environ 70% sont utilisés à des fins non thérapeutiques ; 15,8% d'entre eux sont des tétracyclines, 2,3% des sulfonamides, 1,2% des aminoglycosides, 0,19% des fluoroquinolones. Le nombre d'antibiotiques utilisé dans l'alimentation des animaux aux États-Unis a augmenté de près de 91 000 kg en 1950 à 9,3 millions de kg en 1999 [19] (Figure 3), avec une consommation de tétracyclines qui dépasse les 5,6 millions de livres par an [20, 21].



«Source : [19]»

Figure 3: Pourcentage d'usage d'antibiotiques aux États-Unis en 1999

En Europe, des données publiées par les pays membre de l'Union Européenne (plus la Suisse) affirment que la consommation des agents antimicrobiens en médecine vétérinaire, comme agents thérapeutiques serait de 3 494 tonnes dont près des 2/3: 2 294 tonnes sont



des tétracyclines, 424 tonnes des macrolides, 322 tonnes des pénicillines, 154 tonnes d'aminoglycosides, 43 tonnes de fluoroquinolones, et 75 tonnes d'association de sulfamides avec le triméthoprim [17].

Au Royaume-Uni, [19] ont trouve que les tétracyclines sont les plus largement utilisés comme composés antibactériens, suivies par les sulfamides, les bêta-lactames, les macrolides, les aminoglycosides, les fluoroquinolones et les autres (Tableau1).

Tableau 1: Consommation d'antibiotiques au Royaume-Uni en 2000

Classe thérapeutique	Substance active	Usage (kg)
Tétracycline	Oxytétracycline	8 495
	Chlorotétracycline	6 256
	Tétracycline	1 517
Sulfonamides	Sulfadiazine	14 224
	Sulfadimidine	4 933
	Formosulphatthiazole	859
	Sulfadoxine	545
Béta-lactames	Amoxicilline	17 432
	Procaïne pénicilline	7 223
	Procaïne benzylpénicilline	2 811
	Acide clavulanique	2 194
	Ampicilline	1 487
	Benzatine pénicilline	1 363
	Cloxalline	1 324
	Céphalexine	1 310
	Benzylpénicilline	1 273
	Phénoxyéthyle pénicilline	834
Aminoglycosides	Dihydrostreptomycine	5 978
	Néomycine	1 079
	Apramycine	466
Macrolides	Tylosine	5 144
Fluoroquinolones	Enrofloxacin	799

«adapté de : [19]»

En Afrique (au Kenya ) la consommation d'antibiotiques [19, 22] durant les cinq dernières années étaient de  $14\,595 \pm 1\,457$  kg par an, distribué dans les différents classes comme suit : 7 975 kg (54,65%) des tétracyclines, 3 103,96 kg (21,27%), des sulfamides et de 954,5 kg (6,56%) des aminoglycosides, 905 kg (6,20%) de bêta-lactames, 94 kg (0,64%) des quinolones, 35 kg (0,24%) des macrolides et 24 kg (0,16%) des autres (tiamuline) (Tableau 2).

Tableau 2: Consommation d'antibiotiques au Kenya entre 1995 et 1999

<b>Antibiotiques</b>	<b>1995</b>	<b>1996</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>Totale</b>
<b>Aminoglycosides</b>	308,63	752,13	462,42	2421,52	843,88	957,7
<b>Bêta-lactames</b>	352,9	572,86	480,65	1 921,9	1 195,45	904,72
<b>Tétracyclines</b>	3 664,41	15 889,35	9 215,98	7 782,45	3 324,75	7 975,38
<b>Nitrofuranes</b>	5 244,8	1 155	55	660	385	149,96
<b>Quinolones</b>	25,08	7,7	6,28	177,57	252,14	93,76
<b>Sulfonamides</b>	6 876,65	499	605	934,78	6 604,4	3 103,96
<b>Macrolides</b>	0	165	0	7,79	0	34,56
<b>Autres</b>	24,75	69,30	23,76	0	0	23,56
<b>Totale</b>	16 497,22	19 110,34	13 849,09	13 906,01	12 605,62	14 593,66

«Adapté de : [19]»

La production animale est particulièrement élevée dans des régions comme l'Australie, le Mexique, les États Unis d'Amérique et le Canada [23], il serait donc intéressant de voir la consommation des antibiotiques à usage vétérinaire dans ces pays.

#### **I.4.2. Consommation au Canada**

Au Canada, la province de l'Alberta a la plus forte densité de production de bovins. La moyenne de production annuelle est de 7719 têtes, avec une capacité totale de 1605 450

têtes. L'utilisation des antibiotiques à usage vétérinaire en Amérique du Nord varie entre 1300 et 11200 tonnes par an et elle est de 3800 tonnes annuelle dans l'UE [23].

Les antimicrobiens sont couramment utilisés comme promoteurs de croissances en Amérique du Nord [23-25], plus de 2 millions de kg d'agents antimicrobiens sont administré aux bovins chaque année [26], parmi ces agents et en terme de pourcentage on trouve 90% sont des sulfaméthazine (SMZ), 65% sont des chlortétracycline (CTC) et entre 50% et 100% pour la tylosine (TYL) [23].

L'utilisation des médicaments vétérinaires [27, 28], aura pour effet de générer des résidus de médicaments dans les animaux et par conséquent dans leurs produits laitiers : le lait, les fromages, les yogourts et même dans la viande. Ces derniers peuvent donc causer d'importantes pertes économiques lorsque des lots de produits sont déclassés ou retirés.

À l'heure actuelle, les occurrences de résidus de médicaments en particulier les antibiotiques dans les aliments sont devenus de plus en plus évidentes. D'autres part, l'usage inutile, ou en excès, des antibiotiques dans l'élevage laitier, seraient de même l'une des principales sources de résidus de médicaments vétérinaires dans le lait.

### **I.5. Résidus d'antibiotiques dans le lait**

Le lait est l'un des aliments les plus consommés au niveau mondial, il présente aussi une source de protéines et de calcium essentiel pour la promotion de la croissance, surtout chez les enfants [1]. Toutefois, en raison de mauvaises conditions d'hygiène dans de nombreuses fermes laitières, les vaches ont souvent des ulcères ou des plaies sur les mamelles ceux qui nécessitent des antibiotiques pour les traiter et contrôler leur état. Les producteurs sont tenus alors, de commercialiser un produit exempt d'antibiotiques et doivent prévenir la

présence de résidus illégaux d'antibiotiques dans le lait et par conséquent, il pourrait être très coûteux pour les producteurs qu'un événement malheureux porte atteinte à la réputation du lait.

Au Québec, à titre indicatif, les résidus d'antibiotiques dans le lait ont entraînés en 2002 des pertes économiques de 1,64 millions de dollars. Cela a poussé Santé Canada à établir les niveaux de résidus d'antibiotiques considérés sans risque et dont la présence est acceptable dans les tissus ou dans le lait [29].

#### **I.5.1. Résidus de tétracycline**

Les résidus d'antibiotiques dans les aliments sont une source de préoccupation [30], car ils présentent des risques pour la santé en raison des réactions allergiques qui peuvent leur être associées, de leur pouvoir cancérogène et de l'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques en médecine humaine [19].

Les tétracyclines sont fréquemment utilisées en médecine vétérinaires [19, 31-34]. De nombreuses publications [5, 20, 35-37] se sont intéressées à la détermination des résidus de tétracyclines chez les veaux [38], les moutons, les porcs [39], les volailles, les poissons [40], et même dans le miel [41, 42].

En 1998, la Fédération Européenne de la santé animale a réalisé une enquête sur l'usage des antibiotiques vétérinaires dans les 15 États membres de l'Union Européenne (UE) et la Suisse, il a été constaté que 65% de tous les antibiotiques et des antibactériens consommés pour l'utilisation thérapeutique et la prévention sont des tétracyclines [37].

Vu la consommation accru de ces antimicrobiens, au cours de ces dernières années, il serait important de comprendre, la façon dont les antibiotiques sont utilisés chez les humains et chez les animaux d'élevage et donc de comprendre la façon dont ces utilisations affectent

l'évolution de la résistance antibactérienne, ce qui va nous permettre de développer des stratégies de préventions, et ainsi éviter l'émergence de nouvelles souches résistantes [17, 43] .

Depuis 1969 et durant, ces dernières années, plusieurs études ont montré qu'il existerait un lien directe entre l'utilisation des antibiotiques chez les animaux comme médicaments ou comme adjuvants alimentaires, et l'augmentation du nombre d'organismes résistants qui se développent [17, 43-45]

## **I.6. La résistance aux antibiotiques et son évolution**

La résistance aux antibiotiques est la capacité d'un micro-organisme à résister aux effets des antibiotiques. Les antibiotiques exercent une pression sélective dans l'environnement. Les bactéries présentant une mutation leur permettant de survivre, continuent à se reproduire, en transmettant à leur descendance leurs gènes de résistance, produisant rapidement une génération des bactéries majoritairement résistantes [17, 19, 46].

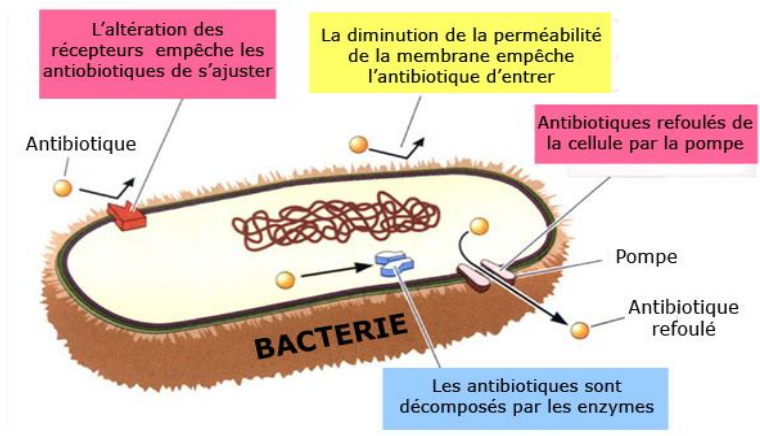
Parmi les facteurs qui contribuent au phénomène de la résistance, on trouve les diagnostics erronés, les prescriptions abusives et l'utilisation inappropriée d'antibiotiques par les éleveurs, par exemple, en complément alimentaire pour une croissance accélérée des animaux d'élevages [17].

La résistance aux antibiotiques peut intervenir par le biais d'un ensemble de mécanismes [47] (Figure 4) :

- La mutation de la cible de l'antibiotique : Chaque antibiotique agit en se fixant sur une cible précise dans la cellule (paroi, ribosome), la présence d'une modification consécutive à une mutation modifie le site de fixation et empêche ainsi la liaison de

l'antibiotique. C'est un des mécanismes de résistance à la streptomycine, l'un des premiers antibiotiques utilisés pour traiter la tuberculose.

- La modification de l'antibiotique : De nombreuses souches résistantes fabriquent une enzyme qui modifie ou qui clive la molécule d'antibiotique, la rendant inactive. C'est le mécanisme principal de résistance aux bêta-lactamines (famille des pénicillines et des céphalosporines) qui implique les enzymes de la famille des bêta-lactamases.
- La réduction de la perméabilité membranaire : La bactérie ferme les pores par lesquels l'antibiotique pénètre dans la cellule. Ces pores sont normalement constitués par des protéines qui forment des canaux et que l'on appelle des porines. Les bactéries résistantes réduisent leur nombre de porines.
- L'efflux des antibiotiques : Les bactéries sont capables d'éliminer les antibiotiques par transport actif hors de la cellule, qui recrache littéralement les composés toxiques en dehors. C'est l'un des principaux mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections nosocomiales.



«Source 47]:»

Figure 4: Les différents mécanismes de résistances

Une exposition prolongée à des résidus d'antibiotiques peut entraîner une augmentation des bactéries résistantes aux médicaments [18]. Par conséquent, la surveillance des résidus d'antibiotiques est très importante dans le contrôle de la sécurité des laits pour la consommation humaine. Pour ces raisons, plusieurs contrôles imposés par l'Union Européenne (UE), la US Food and Drug Administration (FDA), le Ministère de la Fonction publique de la Santé (MOPH) de la Thaïlande, soumettent des limites maximales de résidus (LMR) qui tolèrent seulement d'infimes quantités de résidus d'antibiotiques dans le lait destiné à la consommation humaine (4). Et dans la même approche, plusieurs plans de surveillance des agents antimicrobiens ont été élaborés [48], par des établissements nationaux ou internationaux, parmi eux, on trouve:

- Au plan international et sur la surveillance de la présence des résidus d'antibiotiques chez les animaux, on trouve le Codex Alimentarius qui est un organe subsidiaire de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et de l'organisation mondiale de la santé. Ce codex a été créé pour mettre au point des normes de sécurité alimentaires universellement acceptées [29].



- Au Canada, les résidus dans les aliments ont été testés dans le cadre du Programme National Canadien de surveillance des résidus chimiques. [25, 49].
- Au États-Unis : le NARMS Système National de Surveillance de la Résistance Antimicrobienne des bactéries entériques fondées en 1996.
- Au Suède : le SVARM est un centre de surveillance des antimicrobiens, fondé en 2000.
- En France : l'AFSSA Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Aliments.

Dans de nombreux pays, les autorités gouvernementales ont établi des programmes de surveillance afin de fixer un niveau maximale de résidu (LMR) de ces antibiotiques [50], et diverses méthodes d'analyses ont été décrites afin de déterminer les résidus d'antibiotiques dans le lait [50, 51].

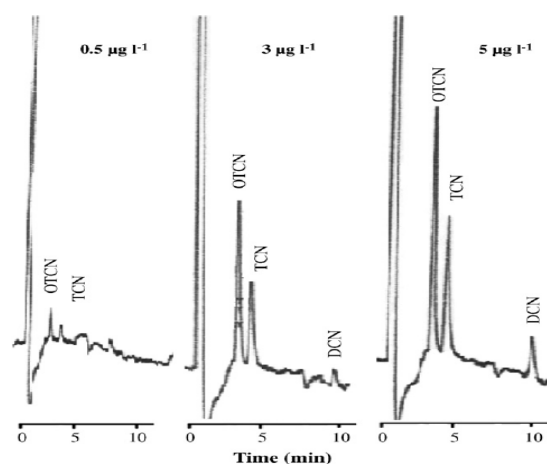
## **I.7. Méthodes de détections des antibiotiques : avantages et inconvénients**

### **I.7.1 Méthodes physico-chimiques**

Les années 80 ont été marquées par le développement de nouvelles méthodes de dépistage, comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [20, 27, 52], la chromatographie sur couche mince (TLC) [41, 42, 45-48] et l'électrophorèse [53].

Bien que ces méthodes, produisent des résultats précis du niveau des résidus d'antibiotiques, elles sont cependant, très coûteuses, très lentes, et demandent des compétences techniques spécialisées.

La (Figure 5) montre les pics de tétracyclines d'un chromatogramme de HPLC-UV (360 nm), les temps de rétention correspondant à ces pics sont de 5 min, avec des aires sous la courbe proportionnelles à la concentration [54].



«Source : [54]»

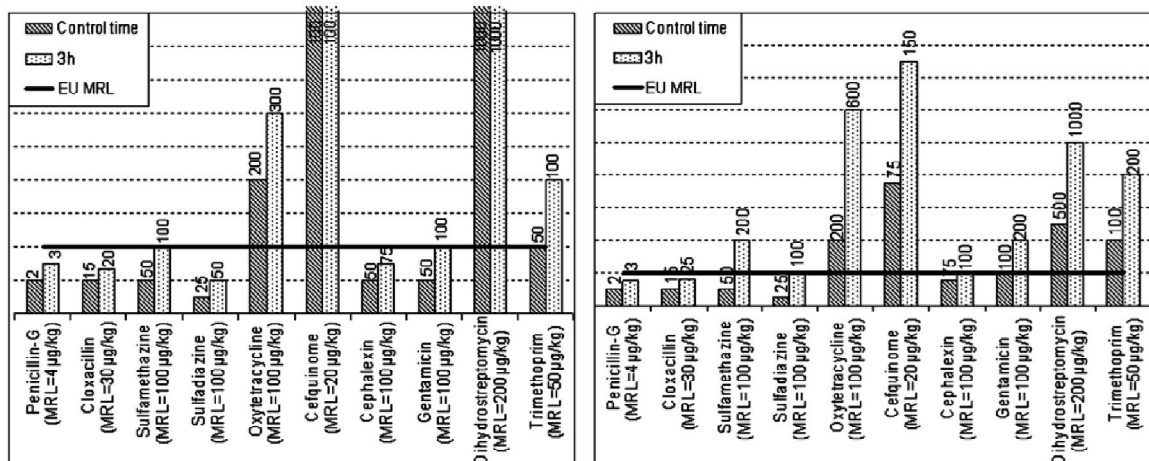
Figure 5: Chromatogramme HPLC de solutions standards de tétracycline à : 0,5, 3 et 5 µg/l

### I.7.2 Tests microbiologiques

Pour le dépistage des résidus d'antibiotiques, les tests microbiologiques sont également utilisés pour la détection d'antibiotiques dans le lait [55]. On peut citer parmi eux, le test Copan, le test Vlio, et le Delvotest [52-54] qui se basent sur la croissance de *Bacillus stearothermophilus calidolactis*, ces tests sont largement utilisés pour le contrôle du lait dans les laboratoires officiels de l'Union Européenne [56].

Bien que ces tests soient peu coûteux, simples, nécessitent peu d'équipement et une infime quantité de lait, ils demandent beaucoup de temps et ils sont non spécifiques et non quantitatifs.

La (Figure 6), montre bien que les deux tests, Copan et Delvo, détectent certains antibiotiques qu'on trouve dans le lait, comme, la pénicilline G, la cloxacilline, la sulfaméthazine, la sulfadiazine, la céphalexine, la gentamicine, et sont moins sensibles pour d'autres comme la tétracycline et l'oxytétracycline [57].



«Source : [57]»

Figure 6: Limite de détection par le test Copan et le test Delvo (en ng/ml)

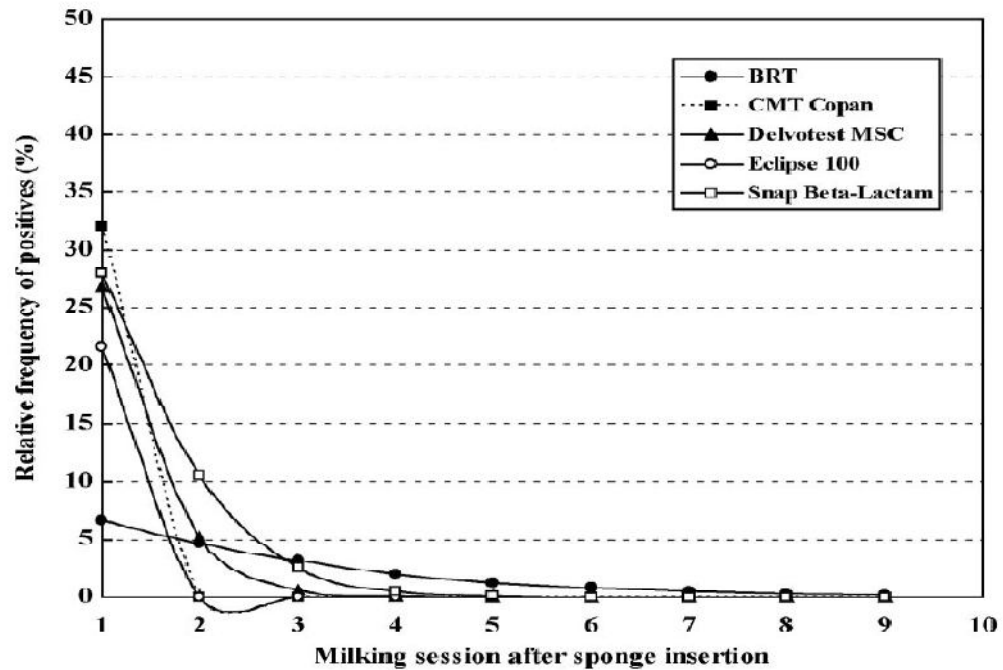
### 1.7.3 Détection rapide

Des tests rapides ont été introduits dans les années 1980. Ils ont été conçus, en tenant compte des besoins des producteurs de lait et de la nécessité de raccourcir le temps des tests de dépistage immédiats d'antibiotiques, il faut 10 à 20 minutes pour terminer l'épreuve.

Basée sur une reconnaissance spécifique de l'antibiotique, parmi les méthodes les plus répondues, on cite le test Charm II® [48, 58], le test ROSA ®, le test SNAP betalactamine® [59] et le test SNAP tetracycline® [48].

Ces méthodes sont beaucoup plus chères que les méthodes microbiologiques et leur principal défaut est le fait qu'il ne détecte que les matériaux qui réagissent avec immobilisation des récepteurs, par exemple, les bêta-lactamines [48].

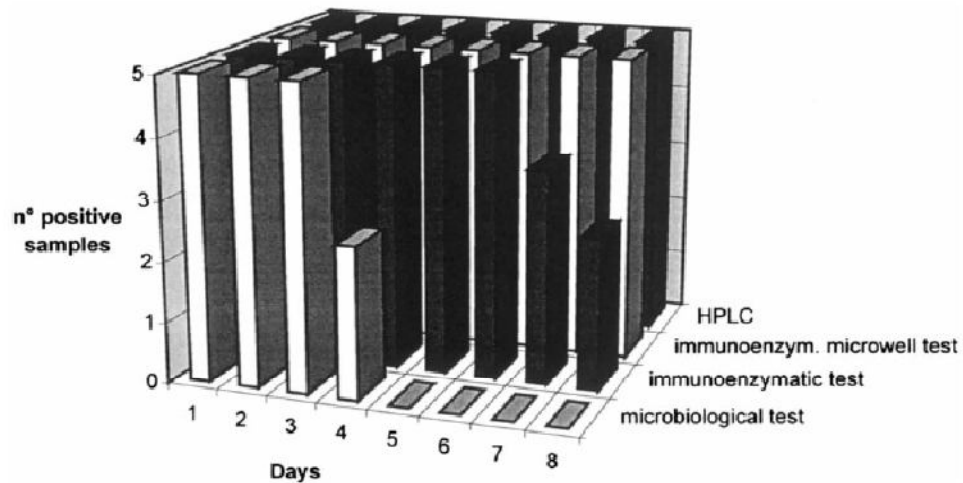
Les tests présentés à la (Figure 7) montrent la fréquence relative de cas douteux ou de cas positifs chez des brebis traitées avec des antibiotiques. Les tests sont : le test BRT®, le test COPAN®, le test DELVO®, le test ECILPSE® 100, et le test SNAP®.



«Source [59]»

Figure 7: Comparaison des différents tests utilisés pour détection d'antibiotiques chez des brebis traités aux antibiotiques

La (Figure 8) montre une comparaison qualitative entre la méthode HPLC et la méthode des tests biologiques appliquées à une même race de mouton, et c'est seulement le test immunoenzymatique sur les deux qui serait comparable à la méthode HPLC, tandis que le test biologique été insuffisant [60].



«Source [60]»

Figure 8: Comparaison qualitative entre la méthode HPLC et les tests biologiques

Ces méthodes efficaces étaient nécessaires pour la détermination des niveaux de résidus d'antibiotiques dans les aliments. [61] Au regard de l'augmentation de l'usage de ces derniers chez les animaux, la FDA et d'autres organismes de réglementation partout dans le monde ont fixé des teneurs maximales en résidus pour être sûrs, qu'elles ne sont pas au-delà de l'ensemble des niveaux de tolérance.

#### I.7.4 Canada : Trousse de détection des résidus à la ferme

Il existe plusieurs sortes de tests de détection qui peuvent être utilisés à la ferme. Chacun a ses propres avantages et désavantages en matière de coût, de rapidité et de sensibilité. Les principaux fournisseurs en Amérique du Nord sont Idexx Laboratories, CHARM Sciences et DSM Food Specialties.

Des trousses de détection sont offertes pour détecter les bêta-lactamines, les tétracyclines et les sulfamides. Il est important toutefois de se rappeler que la majorité des tests ont été mis au point pour le lait de vache et on rapporte qu'ils peuvent parfois donner de faux positifs dans le cas du lait de chèvre. Le problème est principalement attribuable aux différences dans la composition du lait de vache et du lait de chèvre. C'est pourquoi tout résultat positif lors du test de détection initial doit être confirmé par des analyses officielles [62].

### **I.8. La limite maximale de détection des antibiotiques**

Les résidus de médicament vétérinaire [19] sont définis selon le règlement n ° 2377/90 comme des substances pharmacologiquement actives (qu'elles soient sous forme de principes actifs, excipients ou de produit de dégradation) et de leurs métabolites restant dans des denrées alimentaires provenant d'animaux auxquels le médicament vétérinaire en question a été administré.

La limite maximale de résidu (LMR) est fixée en mg / kg (parties par million) ou même en g / kg (parties par mille). Les résidus en dessous de ces limites sont considérés sans danger et les échantillons sont considérés non conformes. La législation diffère considérablement de pays en pays, et ceux pour de nombreux produits alimentaires.

Les LMR sont fondées sur le type et la quantité de résidu considéré comme sans danger toxicologique pour la santé humaine, et sont exprimées par les doses journalières admissibles (DJA) ou sur la base d'une DJA temporaire utilisant un facteur de sécurité supplémentaire.

La FDA a fixé des niveaux d'inquiétudes pour les résidus de la chlorotétracycline, de l'oxytétracycline et la tétracycline dans le lait respectivement de 30, 30 et 80 ng/ml [63], [5]. Une étude en 2007 a publié qu'aux États-Unis, la limite maximale de résidu de tétracycline devrait être de 2 ppm dans les muscles, 6 ppm dans le foie, et de 12 ppm dans

les reins [39]. La limite maximale de tétracycline serait de 100 ng/ml dans le lait et la viande pour les pays de l'Union Européenne [32].

Le (Tableau 3) résume les valeurs de MRL de quelques antibiotiques qu'on trouve dans le lait, fixées par la Food and Drug Administration des États-Unis (FDA), et par la fondation de recherche alimentaire et chimique du Japon [64].

Tableau 3: Valeurs de MRL d'antibiotiques dans le lait donnés par la FDA et la fondation de recherche alimentaire et chimique du Japon

Antibiotiques	MRL par FDA (µg/kg)	MRL par fondation de recherche alimentaire et chimique du Japon (µg/kg)
<b>Pénicilline :</b>		
Amoxicilline	10	8
Ampicilline	10	20
Cloxacilline	10	20
Benzylpénicilline	0	4
<b>Tétracycline :</b>		
Chlorotétracycline	300	100
Oxytétracycline	300	100
Tétracycline	300	100
<b>Aminoglycosides :</b>		
Apramycine		
Dihydrostreptomycine	125	200
Néomycine	150	500
Spectinomycine		200
«Adaptée [64]»		



L'Union Européenne a établi des valeurs de LMR pour les antibiotiques dans le lait qui sont illustrés dans le (Tableau 4).

Tableau 4: Limites maximales de résidus selon l'Union Européenne

Antibiotiques	Espèces Animale	LMR (µg/kg)
<b>Péniciline</b>		
Amoxiciline	Toutes	4
Ampiciline	Toutes	4
Benzylpénicyline	Toutes	4
Cloxacilline	Toutes	30
Dicloxacilline	Toutes	30
Oxacilline	Toutes	30
Penethamate	Bovines	4
<b>Macrolides</b>		
Erythromycine	Toutes	40
Spiramycine	Bovines	200
Tilmicosine	Toutes	50
Tulathromycine	Aucunes	Pas utilisés
Tyrosine	Toutes	50
<b>Tétracyclines</b>		
Chlorotétracycline	Toutes	100
Doxycycline	Bovines	Pas utilisés
Oxytétracycline	Toutes	100
Tétracycline	Toutes	100

«Adaptée de [19]»

Dans le (Tableau 5), figurent les LMR de sulfonamide et de quinolone dans le lait de vache, fixés par l'Union Européenne, par la commission du Codex Alimentarius au Canada et par l'administration de la république de Corée.

Tableau 5: Maximum de résidu de sulfonamides et quinolones dans le lait de vache

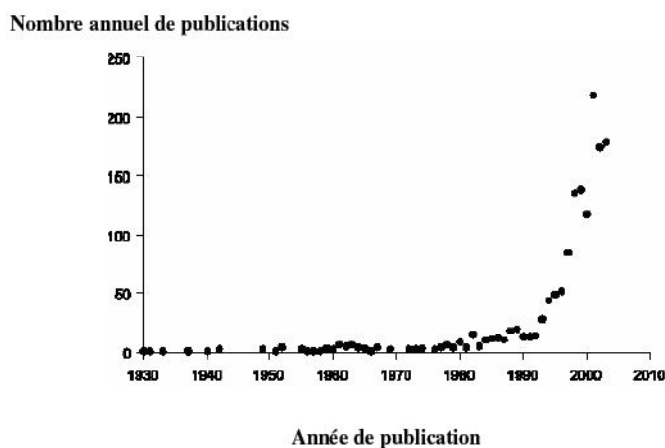
Antibiotiques	UE (µg/kg)	Canada (µg/kg)	République de Corée (µg/kg)
Sulphonamide:			
Sulfamonométhoxine	100 – ∑ des sulfonamides	-	-
Sulfadiméthoxine		-	10
Sulfaméthazine		25	25
Sulfamérazine		-	-
Sulfaquinoxaline		-	-
Quinolone:			
	100 –		
Enrofloxacin	(enrofloxacin+ciprofloxacin)	-	-
Ciprofloxacin		-	-

«Adaptée de [65]»

## II. Polymères à empreintes moléculaires et détections d'antibiotiques

### II.1. Polymères à empreinte moléculaire

Un des moyens de détection des antibiotiques est l'utilisation des polymères à empreintes moléculaires. Depuis leur découverte en 1931 par Polyakov, l'utilisation des polymères à empreintes moléculaires a augmenté (Figure 9), ce qui explique l'augmentation exponentielle du nombre de publications et de brevets dans ce domaine [66, 67].



«Source de [66]»

Figure 9: Augmentation du nombre de publication concernant les MIP

De nombreux laboratoires de recherches se sont intéressés aux MIP et ceci dans de nombreuses applications tels que : analyse d'ampicilline, extraction de la nicotine, dosage de la caféine, séparation des sulfonamides et détection de tyrosine (Tableau 6).

Tableau 6: Liste de quelques applications des polymères à empreintes moléculaires

Molécule cible	Application	Références
<b>Ampicilline</b>	Analyse	[68]
<b>Nicotine</b>	Extraction	[69]
<b>Caféine</b>	Dosage et capteur	[70]
<b>Sulfonamides</b>	Séparation	[71]
<b>Tyrosine</b>	détection	[72]

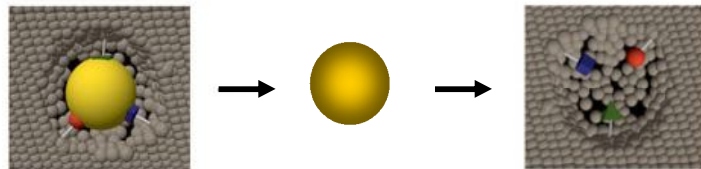
Les polymères à empreintes moléculaires sont des matériaux sur-mesure qui peuvent être utilisés dans plusieurs applications différentes.

Le nombre de publications parues au cours de ces quinze dernières années prouve l'essor des MIP dans les domaines des biotechnologies (capteurs, membranes, sondes) et des méthodes séparatives (extraction solide-liquide (SPE), chromatographie en phase liquide (CPL), électrophorèse capillaire (EC) et électrochromatographie (CEC))[66].

Un MIP est préparé [73] à partir d'une molécule dont on veut faire une empreinte, molécule autour de laquelle un moule de polymère est réalisé. Des empreintes spécifiques à cette molécule sont formées. L'élimination de la molécule empreinte par des procédés adaptés à la nature de la liaison monomère fonctionnel - molécule empreinte, laisse des sites capables de recapturer spécifiquement la molécule empreinte ou des molécules proches en taille et en structure.

Par une voie chimique on va créer un support possédant des cavités dont la forme correspond à l'image inverse de la (ou les) molécule(s) recherchée(s) de la même manière qu'une clé correspond à une serrure donnée [74]. Il s'agit donc de reproduire la

conformation tridimensionnelle de la molécule recherchée (Figure 10). Le résultat de la synthèse est alors appelé polymère à empreintes moléculaires.



«Modifiée de [75]»

Figure 10: Structure tridimensionnel d'un MIP

Les interactions entre le monomère fonctionnel et la molécule empreinte sont fortes (liaisons covalentes, liaisons hydrogène, interactions ioniques).

Spivak définit la sélectivité d'un MIP comme la conséquence de la formation de cavités de formes sélectives au sein de la matrice polymérique, issues de la pré-organisation de groupes fonctionnels autour de la molécule imprimée [76].

Un polymère non imprimé (NIP, du terme anglais Non Imprinted Polymer) est synthétisé en parallèle du MIP afin de comparer le pouvoir de rétention des deux matériaux et de vérifier la sélectivité de recapture du MIP par rapport au NIP vis-à-vis de la molécule empreinte.

## II.2. Caractéristiques des MIP

Le (Tableau7) résume les principales caractéristiques des MIP idéales qu'on cherche à synthétiser dans nos laboratoires [77]. Ces matériaux présentent ainsi des résistances physiques et chimiques très hautes à l'égard des divers facteurs externes dégradants. Ainsi :

- ❑ Les MIP sont remarquablement stables contre les agressions mécaniques, les températures élevées et les hautes pressions.
- ❑ Les MIP sont résistants contre le traitement avec un acide, une base, ou des ions métalliques et ils sont stables dans un large éventail de solvants.
- ❑ La durée de conservation des polymères est également très élevée : le stockage pendant plusieurs années à la température ambiante ne conduit à aucune réduction de performance.
- ❑ En outre, les polymères peuvent être utilisés de façon répétée, en plus de 100 fois sans perte de l'effet de mémoire.

Tableau 7: Les caractéristiques des polymères à empreintes moléculaires

Fonction	Caractéristiques
Stabilité physique	Résistant au stress mécanique
Stabilité chimique	Résistant à l'effet des acides, des bases, de divers solvants organiques
Stockage	$\geq 8$ mois sans perdre de sa performance
Capacité	0,1-1 mg empreinte moléculaire/g polymère
Mémoire de l'empreinte	Usage répétée $\geq 100$ fois sans réduction
Pourcentage de recouvrement	$\geq 99$ %

«Adaptée de [77]»

### II.3. Différentes approches de synthèses des MIP

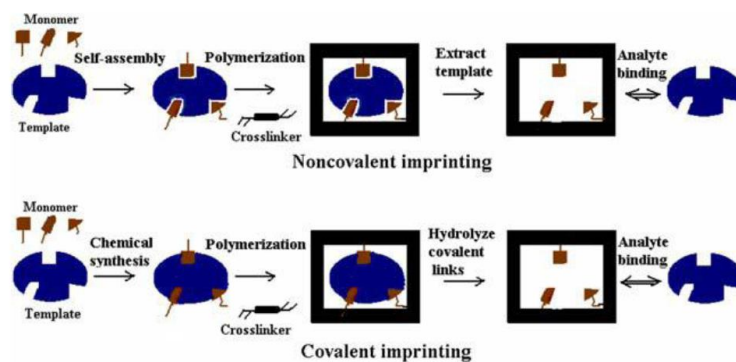
#### II.3.1 Approche covalente

Les synthèses de MIP par voie covalente [78] ont été mises en place et étudiées par l'équipe de Wulff, celle de Shea et celle de Damen et Neckers [79]. La molécule empreinte est liée de façon covalente à un ou deux groupes polymérisables. Lorsque la polymérisation est terminée, la liaison molécule - monomère est rompue par hydrolyse ou par réaction de clivage spécifique de la liaison ciblée. Cette liaison covalente est capable de se former à nouveau lorsque le polymère est en contact avec la molécule empreinte ou un analogue doté de la même fonction. Seuls des composés ayant des groupements fonctionnels particuliers

sont utilisés comme molécule empreinte: alcool avec la formation d'un ester, aldéhyde et amine avec la formation d'une base de Schiff. Gallego-Gallegos a montré [80] une grande homogénéité des cavités formées par voie covalente, avec une affinité élevée de ces dernières pour la molécule empreinte. Cependant, la cinétique de recapture est souvent lente et rend le processus covalent inadéquat (Figure 11).

### II.3.2 Approche non-covalente

L'approche non covalente a été proposée dès les années 1990 par Sellergren puis développée, étudiée et optimisée par de nombreuses autres équipes dont celle de Mosbach. Les interactions entre monomères fonctionnels et molécule empreinte au cours de la polymérisation sont identiques à celles réalisées par la suite entre le polymère et la molécule recherchée lors de l'étape de recapture. Il s'agit d'interactions faibles de nature non covalente (liaisons hydrogènes, dipôle-dipôle, interactions ioniques [78] (Figure 11).



«Source de [81]»

Figure 11: Approche covalente et non-covalent

### II.3.3 Une nouvelle approche

Cette approche non-covalente a été choisie.



Comme modèle médicamenteux antibiotique nous avons choisi la tétracycline. Il fallait choisir un polymère pour fabriquer la matrice, nous avons choisi les polyesters issus de l'acide lactique (PLA) comme polymère de base.

La polymérisation est faite et l'empreinte est produite par un mécanisme strictement physique, le protocole de synthèse de MIP, consiste à piéger l'antibiotique (la tétracycline) dans un nuage polymérique (PLAOH- PLACOOH- PLAPh).

### **III. Les polylactides**

Les polyesters aliphatiques tels que, le polylactide (PLA), le polyglycolide, le polycaprolactone, ont reçu depuis plusieurs décennies une attention considérable en raison de leur large spectre d'application dans le domaine nutritionnel et dans le domaine médicale. Par exemple, le plastique des sacs et des bouteilles biodégradables utilisées dans l'industrie alimentaire, les fils biorésorbables des sutures chirurgicales, certains bandages sont composés principalement de ces polymères [82-85].

Toutefois, le PLA présente quelques inconvénients [86] énumérés comme suit:

- ☐ En raison d'une forte hydrophobicité : l'absence de groupes hydrophiles dans sa chaîne moléculaire, ce qui conduit à une mauvaise pénétration cellulaire.
- ☐ L'absence de groupes fonctionnels, qui limite son application.
- ☐ Augmentation de l'acidité du milieu au cours de la dégradation du PLA.

Afin de surmonter ces problèmes, de nombreux groupes de recherches se sont intéressés à la modification chimique du PLA. Des approches communes impliquant l'introduction de divers produits chimiques contenant des groupements fonctionnels dans sa chaîne latérale (par exemple, groupement amine, groupement carboxyle, ou groupement hydroxyle).

Le polylactide (PLA) est un polymère dont la configuration chimique est représentée ci-dessous (Figure 12) :

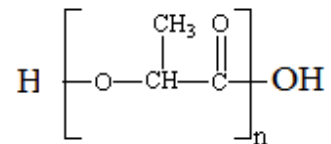


Figure 12: Structure chimique du polylactide

Le PLA est un polymère, aliphatique, thermoplastique et entièrement biodégradable grâce à ses excellentes propriétés mécaniques [87] et sa décomposition naturelle [82].

Le PLA est donc l'un de ces polymères, dans lequel les longues molécules filiformes sont construites par la réaction d'un groupement acide d'une molécule d'acide lactique sur le groupement hydroxyle d'une autre pour donner une jonction ester.

En raison de la nature chirale de l'acide lactique [88], plusieurs formes distinctes de polylactide existent. Le poly-L-lactide (PLLA) est le produit résultant de la polymérisation de l'acide L lactique.

Comme la plupart des autres polyesters, ce PLLA a une cristallinité faible de l'ordre de 37%., une température de transition vitreuse entre 50-80 °C et une température de fusion entre 173-178 °C [89]

Dans notre cas le DL PLA est un polymère issu de la polymérisation du racémique de l'acide lactique. C'est un polymère totalement amorphe dont la température de transition vitreuse est de 60 °C environ. Pour faire une synthèse plus efficace, on utilise en fait un dimère cyclique de l'acide lactique, le DL dilactide.

## **IV. Le projet**

Dans ce travail, une approche plutôt originale a été retenue dans notre laboratoire, et qui consiste à fabriquer des MIP à partir de polymères déjà construits, en l'occurrence des polyesters et plus précisément de l'acide polylactique fonctionnalisé.

### **IV.1. Les hypothèses de notre travail**

Dans notre travail il est question de détecter la tétracycline, pour cela on a choisit l'approche non covalente connue pour son efficacité et les polyesters (le polylactide qui est non toxique, facile à synthétiser.....). En se basant sur un travail précédant [29] qui a montré l'efficacité des polyesters pour la fabrication des MIP avec une composition de 1/3 PLAOH, 1/3 PLACOOH et 1/3 PLAObn une nouvelle hypothèse est venue s'ajouter, proposant une augmentation de la portion de PLAPh dans quatre nouveaux lots de MIP. Cette augmentation aura un effet direct sur l'augmentation du nombre de site d'interaction spécifique avec la tétracycline; cette même augmentation pourrait-elle avoir une conséquence directe sur le pourcentage de rétention de la tétracycline à travers les MIP. Pour vérifier cette hypothèse on a fixé un certains nombres d'objectifs qui sont les suivants :

### **IV.2. Les objectifs**

- ❑ Synthétiser et caractériser les trois polymères qui sont le PLAOH, PLACOOH et PLAPh.

- ❑ À l'aide de ces trois polymères, préparer et caractériser des polymères à empreintes moléculaires (MIP).
- ❑ Améliorer le pourcentage de rétention de tétracycline à travers des MIP en modifiant les portions des trois polymères et voir si le pourcentage de recouvrement de tétracycline est supérieur ou pas à 55 %. Ce pourcentage qui avait été trouvé avec 1/3 de PLA<sub>OH</sub>, 1/3 de PLACOOH et 1/3 de PLAObn [29].

## Matériels et méthodes

Tous les matériaux sont fournis par Sigma Aldrich (Ontario, Canada), et les solvants par le laboratoire MAT INC, (Montréal, Canada).

### I Synthèses et fabrication des polymères

La première synthèse des polymères (PLA-allyle, PLA-OH, et PLACOOH) durant la première période du projet est faite en suivant un protocole déjà réalisé par un autre étudiant du laboratoire dans un projet similaire [29] selon le schéma suivant (Figure 13):

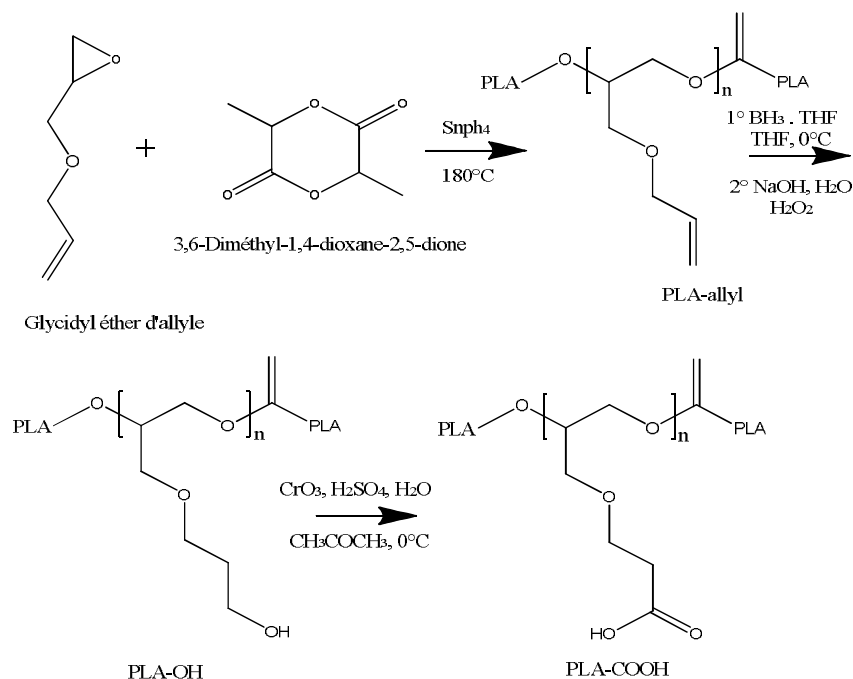


Figure 13 : Schéma de synthèse des polymères PLA-allyle, PLA-OH, PLACOOH

## I.1. Protocole de synthèse

### I.1.1 Synthèse de PLA-allyl : Réaction de polymérisation du 3,6-diméthyl-1,4-dioxane-2,5-dione en PLA-allyl

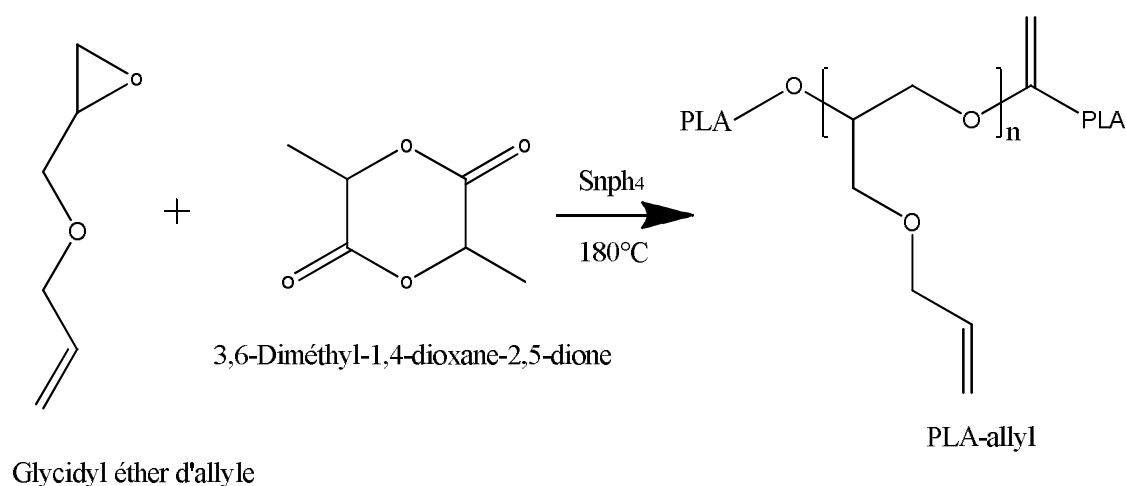
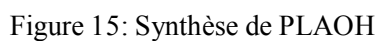


Figure 14: synthèse de PLA-allyl

- Mélanger géométriquement du dilactide et du  $\text{SnPh}_4$  (avec un ratio de 1 :10 000), et mettre le mélange dans un ballon.
- Disperser le tout dans 50 ml de toluène.
- Évaporer le toluène avec un évaporateur rotatif (140 rpm, 45 °C).
- Ajouter le volume calculé de glycidyl éther.
- Préchauffer le bain de paraffine et le régler à 180 °C.
- Placer le ballon, purger le système à l'argon.
- Laisser réagir pendant 6 h.

- ### I.1.2 Synthèse de PLA-OH : hydroboration d'un alcène



- 38

- Ajouter par la suite NaOH (1,5 équivalent /allyle).
- Ajouter le volume calculé de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et laisser agiter pendant 1 heure.
- Ajouter 50 ml d'eau.
- Évaporer le THF à l'aide de l'évaporateur rotatif (bain a 42 °C).
- Éventuellement mettre le ballon sur glace quelques minutes pour favoriser la solidification du polymère, jeter l'eau.
- Lavage à l'acétate d'éthyle : resuspendre le polymère dans 50 ml d'AcEt. Une fois le polymère dissous ajouter 100 ml d'eau et agiter.
- Évaporer le solvant, et jeter l'eau (couleur verte foncée).
- Le polymère récupéré est blanchâtre avec une teinte verte.
- Répéter le lavage 2 à 3 fois avec 50 ml de AcEt/100ml d'eau, et évaporer le solvant.
- Sécher sous pression réduite toute la nuit.

### I.1.3 Synthèse de PLA-COOH : Réaction de Jones

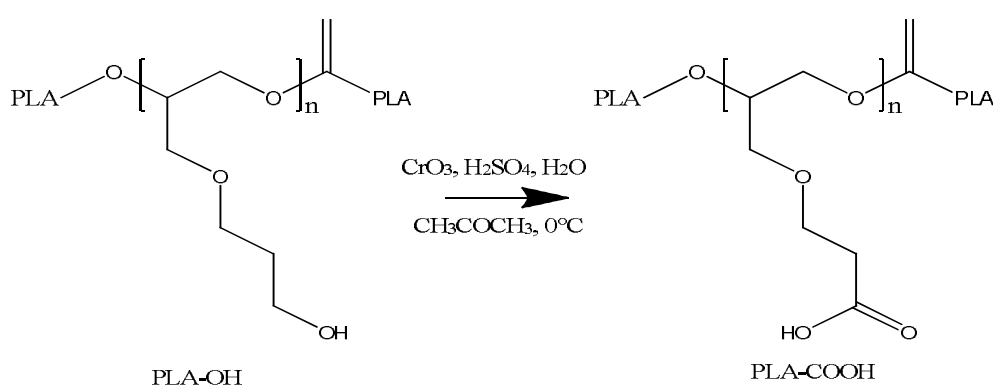


Figure 16: Synthèse de PLACOOH



- Dissoudre le PLA<sub>OH</sub> dans 100 ml d'acétone. Bouchon (en caoutchouc avec une aiguille pour éviter la surpression) et placer sur bain de glace (0 °C).
- Ajouter lentement la solution de Jones. La solution passe du jaunâtre au vert au gris-vert.
- Retirer du bain de glace après une dizaine de minute.
- Le reste de la réaction se fait à température de la pièce. Durée de la réaction 2h 30 min.  
À la fin : couleur bleu-vert.
- Ajouter 30 ml isopropanol. Ajouter 50 ml de HCl 1N.
- Évaporer (50 °C) l'acétone sous vide.
- Le solvant organique éliminé, le polymère se présente sous la forme de blocs blanchâtres flottant dans l'eau bleue-verte. Si nécessaire refroidir le polymère sur lit de glace pour favoriser sa solidification. Jeter la phase aqueuse (verte).
- Lavage trois fois : acétate éthyle 650 ml + 100 ml eau. Évaporer le solvant. Jeter l'eau. (répéter jusqu'à ce que l'eau soit limpide sans la couleur verte apparente indicative de la présence de chrome).
- Sécher sous pression réduite toute la nuit.

#### **I.1.4 Synthèse de PLAPh**

Pour le PLAPh, il n'a pas été possible de suivre le protocole déjà utilisé dans le laboratoire. La récupération d'un précipité de PLAPh était un échec. On est donc inspiré de la synthèse du PLA-allyl, déjà citée précédemment, en remplaçant le glycidyl éther par le glycidyl phényle éther, et en respectant les mêmes conditions.

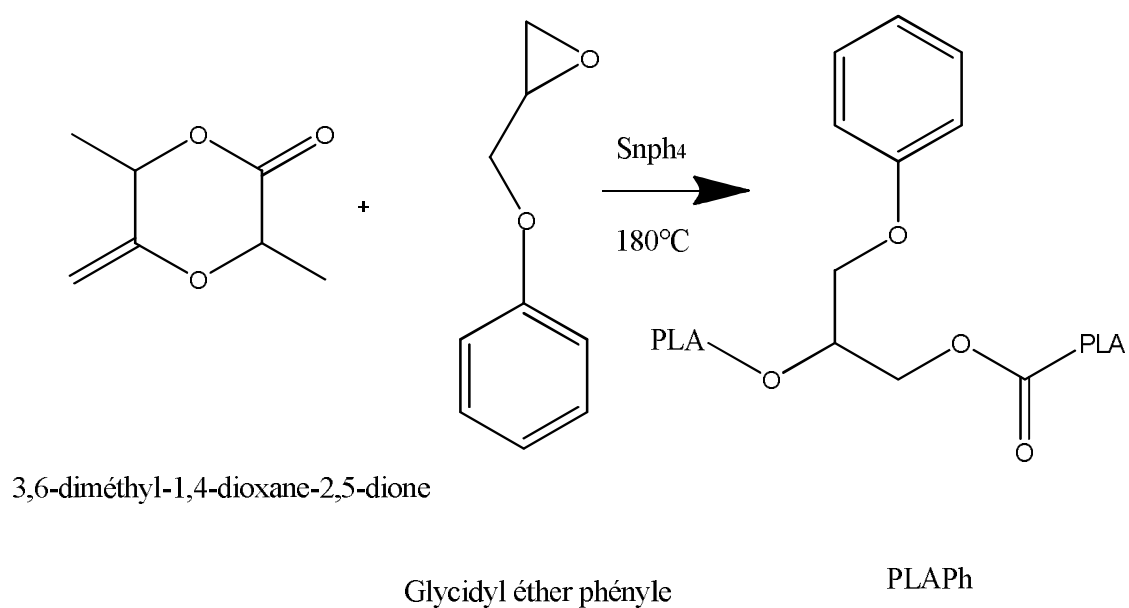


Figure 17: Synthèse de PLAPh

## II Synthèse des MIP de PLA

Trois étapes sont à suivre :

- l'imprégnation des MIP.
- Le lavage des MIP.
- Et la reconnaissance ou la recapture de l'antibiotique.

### II.1. Préparation des MIP

Une approche plutôt originale a été retenue dans notre laboratoire [29]. Elle consiste à fabriquer des MIP à partir de polymères déjà construits, en l'occurrence des polyesters et plus précisément de l'acide polylactique fonctionnalisé.

La polymérisation est faite selon le protocole et l'empreinte est produite par un mécanisme strictement physique.

Pour la fabrication des MIP, comme déjà mentionné, on a suivi une méthode de travail déjà validée antérieurement [29]. On s'est inspiré des méthodes d'arrimage entre une substance active et son récepteur. C'est à dire d'augmenter le nombre de liaisons spécifiques entre les deux entités.

Ainsi on a préparé 4 lots de masse totale de 1 gramme et de compositions en masse:

Premier lot : 1/2 de PLA<sub>OH</sub>, 1/4 de PLACOOH, et 1/4 de PLAPh.

Deuxième lot : 1/4 de PLA<sub>OH</sub>, 1/2 de PLACOOH, et 1/4 de PLAPh.

Troisième lot : 1/4 de PLA<sub>OH</sub>, 1/4 de PLACOOH, et 1/2 de PLAPh.

Quatrième lot : 1/6 de PLA<sub>OH</sub>, 1/6 de PLACOOH, et 2/3 de PLAPh.

Les trois polymères (masse totale de 1g dissoute dans 25 ml d'acétone) sont laissés sous agitation dans 25 ml d'une solution de tétracycline (de titre 1 µg/l) pendant 3 heures. Après évaporation des solvants et séchage, les MIP sont récupérés, puis broyés à l'aide d'un mortier et enfin gardés au congélateur à une température de - 4°C [29].

## **II.2. Le lavage des MIP**

Le lavage des MIP est fait avec du méthanol à 99.9 % car il solubilise la tétracycline mais pas les polymères.

La méthode de lavage de nos MIP était la suivant [29] :

- Dans des tubes de 15 ml, on met 50 mg de MIP avec 13 ml de méthanol, on agite sous vortex pendant 10 min.
- On centrifuge à 3000 G, à une température stable de 20°C pendant 15 min.

- On récupère le surnageant, et on prend un échantillon qu'on fait passer dans le HPLC pour une détection de TC.
- On répète l'opération 6 fois jusqu'à disparition du pic de TC.

### **II.3. La recapture**

Pour la phase de reconnaissance, les MIP lavés sont à nouveau incubés pendant 24 heures dans une solution de tétracycline de titre connu (1µg/l) [29].

### **II.4. La quantification de la tétracycline capturée par l'empreinte**

Après l'étape de reconnaissance, les MIP sont placés dans une solution de méthanol (ou la tétracycline sera soluble). La tétracycline libérée dans le filtrat est quantifiée par HPLC-UV [29].

## **III NIP de PLA**

Les NIP sont des (non –imprinted -polymer), polymères non imprimés, comme leur nom l'indique, et toute au long de ce travail expérimental, pour montrer la spécificité de nos MIP pour la tétracycline, on va synthétiser quatre mélanges de NIP, comme contrôle, dans les mêmes conditions que les MIP, lors de la fabrication des NIP, il n'y aura pas d'étape d'impression, préliminaire.

## **IV Appareillages**

### **IV.1. RMN <sup>1</sup>H (Résonance Magnétique Nucléaire)**

Pour la caractérisation de nos polymères, on a utilisé un spectrophotomètre Bruker ARX 400 MHz, en utilisant le TMS (tétraméthylsilane comme standard interne dans CDCl<sub>3</sub>).

## **IV.2. HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance)**

Nous avons utilisé une technique de dosage et séparation par HPLC (Waters 717 Autosampler avec une interface Hitachi D7000, et une pompe Waters 616, (Milford, Massachusetts) sur une colonne C8 de 5  $\mu$ m BDS130A, 150×4.6 mm (Phenomenex, Canada), avec un détecteur UV à 350 nm.

## **IV.3. GPC (Gel Permeation Chromatography)**

Pour calculer les poids moléculaires de nos polymères le PLA<sub>OH</sub>, le PLA<sub>COOH</sub> et le PLA<sub>Ph</sub>, on a utilisé un GPC : Chromatographie d'exclusion de taille avec un système GPCV 2000 (Watters, Milford, MA) avec un indice de réfraction à haute définition.

THF: solvant

Débit: 0,8 ml / min

Température: 40 ° C

Colonne: Trois colonnes Watters styrogel (HR2, HR3 et HR4)

Les standards: polystyrène

## **IV.4. DSC (Differential Scanning Calorimetry)**

Pour étudier la stabilité thermique de nos polymères et de nos NIP, on a utilisé un DSC Q1000, V9.0, build 275, Universal 4.1 D, TA Instruments, New Castle, USA. Le DSC a été réglé à une température minimale de -30 °C et une température maximale de 150 °C, avec

Une vitesse de chauffage égale à 5 °C/min,

Un nombre de passage égale à deux,

Une quantité de l'échantillon égale à 50 microgrammes,

Et une cupule d'aluminium fermé.

On a obtenu des courbes représentant le flux de chaleur en fonction de la température. Le standard de calibration est de l'Indium.

## Résultats et discussions

La synthèse du polylactide était faite selon un processus de polycondensation par ouverture du cycle, sur ce polylactide on a greffé des groupements fonctionnels (un alcool, un acide et un phényle) et afin de les identifier on a réalisé les analyses suivantes.

### I. Analyses par RMN de proton

Des spectres  $^1\text{H}$  RMN ont été réalisés pour l'identification de nos trois polymères le PLA<sub>OH</sub>, PLA<sub>COOH</sub> et PLA<sub>Ph</sub> (Figure 18).

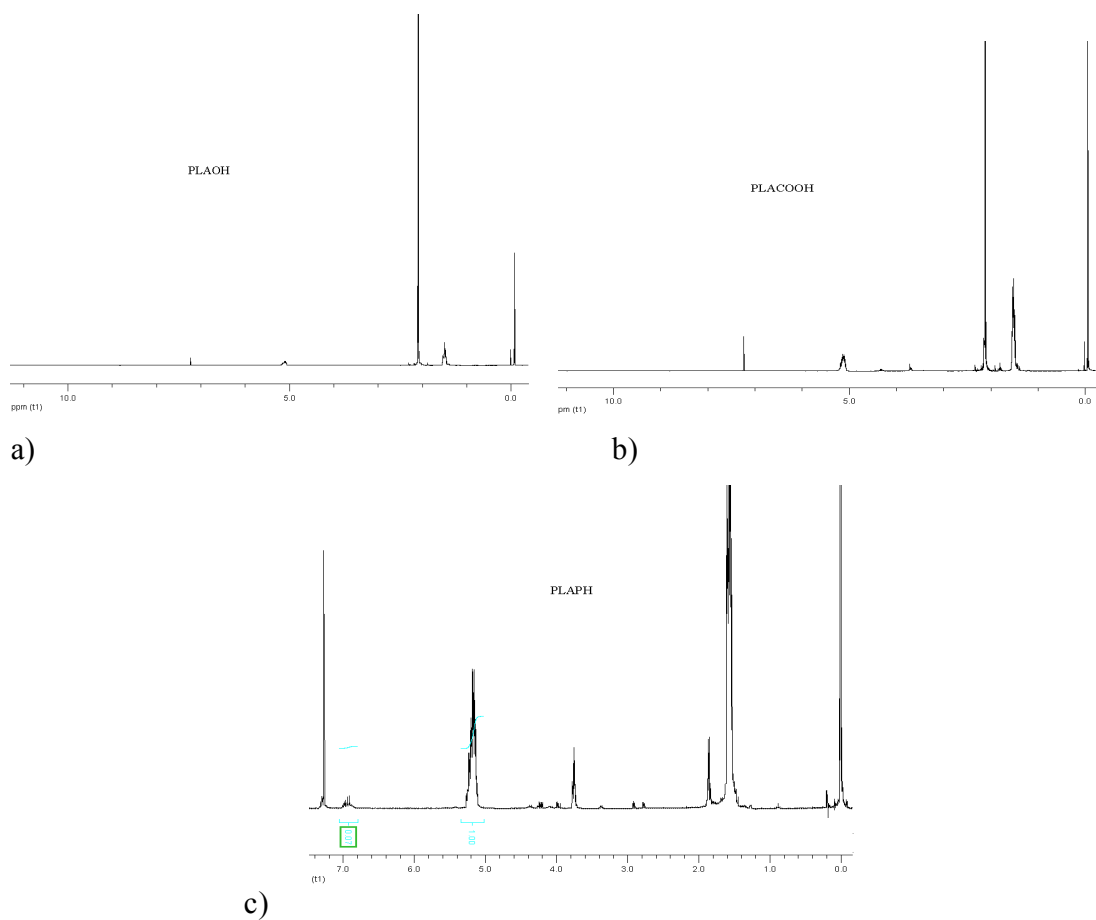


Figure 18: Spectre  $^1\text{H}$  RMN de : a) PLA-OH, b) PLA-COOH, c) PLA-Ph

Pour les trois polymères, le PLA-OH, le PLA-COOH et le PLA-Ph, on observe les signaux caractéristiques du PLA, à 1,2 ppm les pics de  $\text{CH}_3$  en bout de chaîne du PLA, et à 5,1 ppm les pics de CH dans la chaîne du PLA, et pour le PLA-Ph, on voit aussi un autre massif à 7,1 ppm c'est le pic caractéristique du groupement phényle. Ceci montre bien que le greffage de notre phényle est réussi. On a pu calculer un pourcentage de greffage égale à 2,7%.

On a essayé cette nouvelle méthode de greffage du phényle pour la première fois dans notre laboratoire, cette technique s'avère très intéressante, elle se fait en une seule étape, en



utilisant le glycidyl phényle éther, (méthode déjà expliquée), et elle nous donne un pourcentage de greffage assez satisfaisant.

## II. Analyses par GPC

La détermination des poids moléculaires a été réalisée par chromatographie d'exclusion de taille (GPC) (Tableau 8).

Tableau 8: Analyse par GPC de PLAOH, et du PLACOOH

Polymère	PLAOH	PLACOOH	PLAPh
<b>M<sub>w</sub></b>	45 000	45 000	25 000
<b>M<sub>n</sub></b>	31 500	31 000	19 265
<b>Polydispersité</b>	1,43	1,45	1,29

M<sub>w</sub> : Masse molaire moyenne en poids.

M<sub>n</sub> : Masse molaire moyenne en nombres.

Indice de polydispersité : c'est le rapport Mw/Mn, il donne une première idée de la distribution des masses molaires des différentes macromolécules au sein du polymère. Pour un polymère parfait, où toutes les macromolécules auraient même longueur (et donc même masse molaire), il serait égal à 1 (Le polymère idéal a un indice proche de 1).

Les masses molaires de nos trois polymères : PLAOH, PLACOOH, et PLAPh sont respectivement : 45 000, 45 000 et 25 000, on voit bien à travers ces résultats que les conditions de synthèse pour le PLAOOH et le PLACOOH n'ont pas affectés les masses molaires. Les masses molaires du PLAOH et du PLACOH sont élevées et identiques avec des polydispersités très proches de 1.

Avec des polymères de masses molaires élevées, on peut estimer qu'on aura des MIP assez rigides.

### III. Analyses par DSC

Pour avoir une idée sur la stabilité de nos MIP, on a procédé à des analyses par DSC de nos trois polymères : PLA<sub>OH</sub> seul (Figure 19a), PLACOOH seul (Figure 19b), et PLA<sub>Ph</sub> seul (Figure 19c), un mélange physique de composition 1/3 PLA<sub>OH</sub>, 1/3 PLACOOH et 1/3 PLA<sub>Ph</sub> des trois polymères (Figure 20), les quatre lots de NIP (Figure 21) :

Premier lot : NIP de composition 1/4 PLA<sub>OH</sub>- 1/2 PLACOOH- 1/4 PLA<sub>Ph</sub> (Figure 21a).

Deuxième lot : NIP de composition 1/4 PLA<sub>OH</sub>- 1/2 PLACOOH-1/4 PLA<sub>Ph</sub> (Figure 21b).

Troisième lot : NIP de composition 1/4 PLACOOH- 1/2 PLA<sub>OH</sub>- 1/4 PLA<sub>Ph</sub> (Figure 21c).

Quatrième lot : NIP de composition de 1/6 PLA<sub>OH</sub>- 1/6 PLACOOH- 2/3 PLA<sub>Ph</sub> (Figure 21d).

On a jugé qu'il était inutile de procéder à l'analyse de nos lots de MIP de tétracycline car la température de décomposition de la tétracycline est de 215 °C [90] ce qui dépasse les 150 °C, Or pour une  $T \geq 150$  °C, on assiste à une décomposition des polymères PLA.

Pour les thermogrammes des figures 19, 20 et 21 on va appliquer la méthode de la tangente pour déterminer la T<sub>g</sub>. La température de transition vitreuse d'un matériau, T<sub>g</sub>, est la température en-dessous de laquelle les molécules présentent une faible mobilité relative. Elle correspond à leur plus grande capacité de déformation.

C'est pour cette raison qu'on s'est intéressé à la détermination de la T<sub>g</sub> de nos polymères, car c'est très important pour nous de connaître l'état physique de nos polymères qui serviront à la suite à la fabrication de nos MIP, sachant qu'avec une T<sub>g</sub> trop basse on pourrait perdre l'empreinte pendant les différentes opérations.

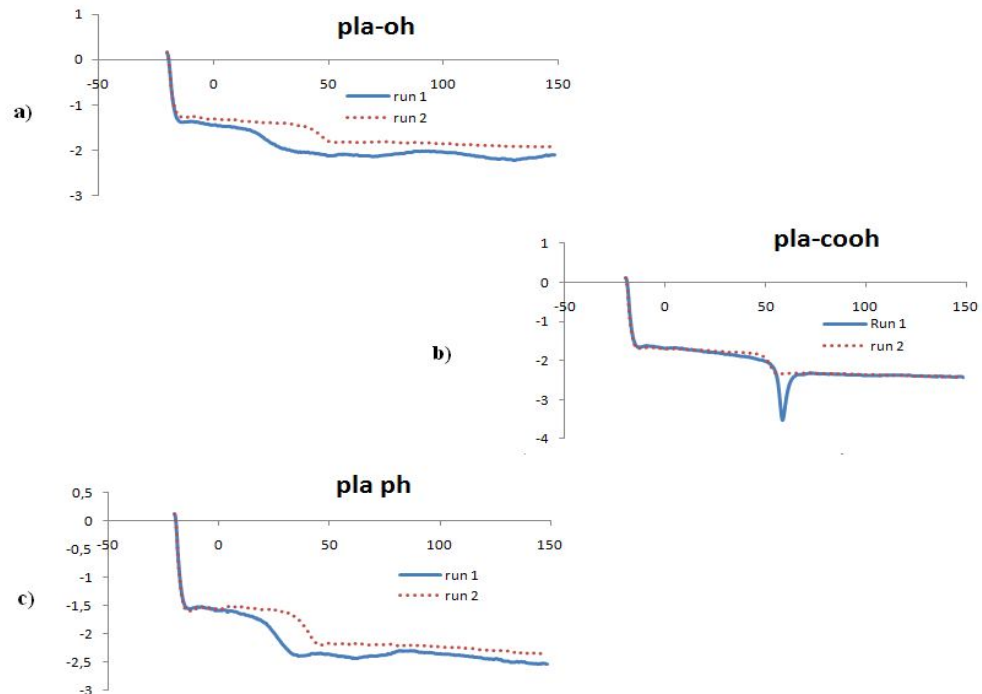


Figure 19: Thermogrammes représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C de :  
a) PLA<sub>OH</sub> seul, b) PLA<sub>COOH</sub> seul, c) PLA<sub>Ph</sub> seul.

Pour ces thermogrammes on trouve que dans la figure 19a et 19c : on voit qu'on a un deuxième balayage plus claire que le premier est ceci est dû à l'effet du solvant dans le premier qui après chauffage a été éliminé, avec une  $T_g$  égale à 52 °C pour le PLA<sub>OH</sub> et une  $T_g$  égale à 48 °C pour le PLA<sub>Ph</sub>.

Et pour la figure 19b : le pic n'est pas du à un solvant mais correspond à une relaxation lente avec une  $T_g$  égale à 50 °C.

On pourrait constater aussi que Pour les PLA<sub>OH</sub> et PLA<sub>COOH</sub>, on voit que la  $T_g$  de PLA<sub>OH</sub> est supérieur à la  $T_g$  de PLA<sub>COOH</sub>, et ceci est dû à ce que; plus le groupement est polaire plus la  $T_g$  augmente (en raison de l'augmentation des liaisons de van der Waals et

des liaisons hydrogène) [91], Pour la même raison on assiste à une diminution de la  $T_g$  du PLAPh.

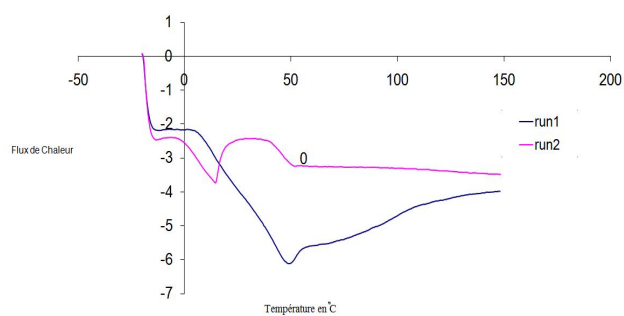


Figure 20: Thermogramme d'un mélange physique de 1/3 PLACOH- 1/3 PLACOOH- 1/3 PLAPh

Dans la figure 20, pour un mélange équimolaire des trois polymères on trouve une  $T_g$  égale à 49 °C.

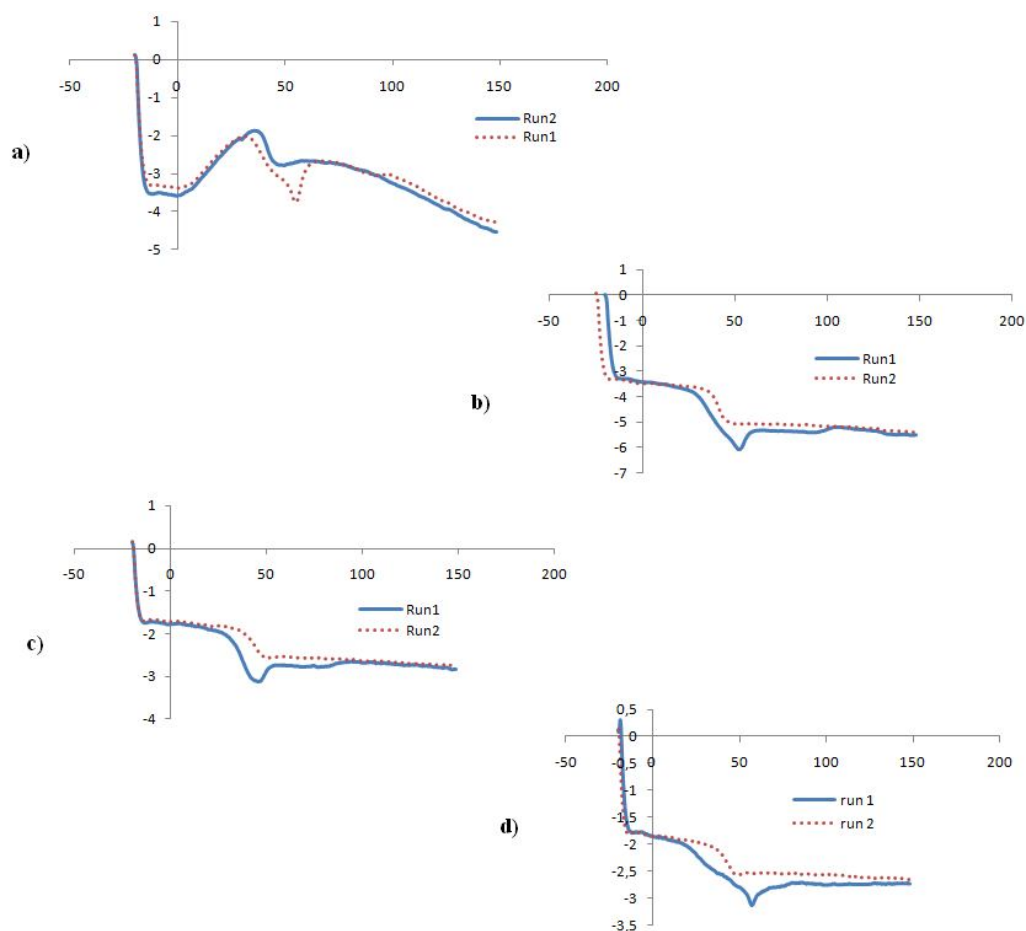


Figure 21: Thermogrammes représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C des mélanges de NIP de compositions : a) 1/4 PLA<sub>OH</sub>- 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAPh, b) 1/4 PLACOOH- 1/2 PLA<sub>OH</sub>- 1/4 PLAPh, c) 1/4 PLA<sub>OH</sub>- 1/4 PLACOOH- 1/2 PLAPh, d) 1/6 PLA<sub>OH</sub>- 1/6 PLACOOH- 2/3 PLAPh

Pour les figures 21b, 21c, on a un DSC plutôt clair avec une  $T_g$  presque égale à 50 °C pour les deux lots de NIP, pour la figure 21d, on voit une légère augmentation de la  $T_g$  alors qu'on devrait s'attendre à une diminution de la  $T_g$  vu qu'on a augmenté la portion de groupement phényle à 2/3.

On retrouve aussi l'effet du solvant au premier passage qui disparaît au deuxième passage. On pourra ajouter que la tangente d'un mélange de polymères diminue par rapport à la tangente du polymère seul, et on pourra recommander alors avec une tangente assez élevée de conserver nos MIP à basse température parce qu'ils ne risquent pas de se déformer.

#### IV. Courbe de calibration (pour la quantification de la tétracycline par HPLC)

Pour les besoins de calibration, quatre solutions de tétracycline dans le méthanol ont été préparées. Les concentrations sont respectivement 0,2 µg/l, 0,4 µg/l, 0,75 µg/l et 1 µg/l (Figure 22).

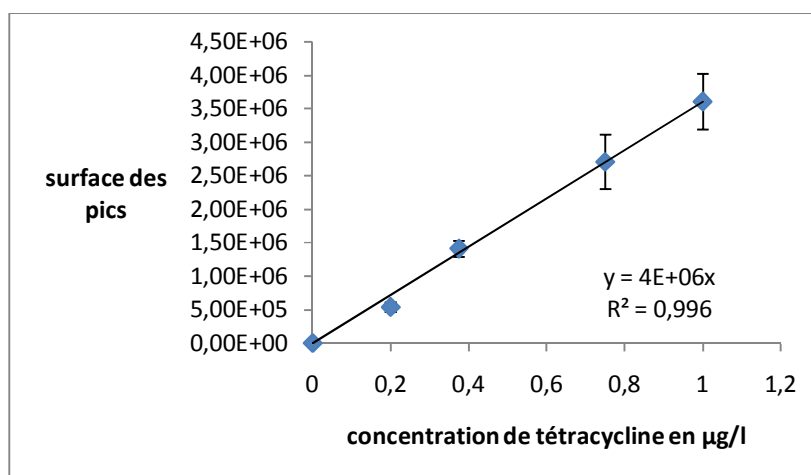


Figure 22: Courbe de calibration de tétracycline en µg/l

## V. Dosage par HPLC-UV

La méthode de quantification est assez simple. Les échantillons sont placés dans le HPLC, on obtient une courbe d'intensité en fonction du temps de rétention, pour chaque lot de MIP et NIP cette opération est répétée trois fois.

Pour tester l'efficacité de la reconnaissance des MIP, et après incubation d'une solution de tétracycline de concentration de 1  $\mu\text{g/l}$  sous agitation pendant 24 heures, des échantillons sont récupérés au fur et à mesure afin d'observer la quantité de tétracycline dans les mélanges.

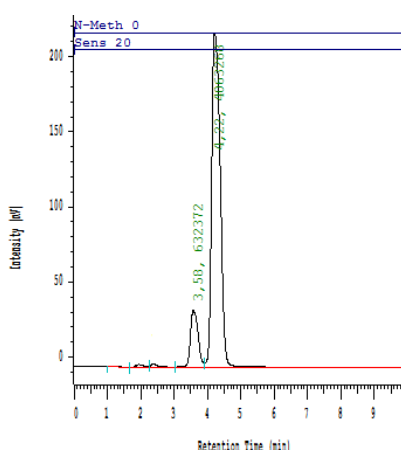
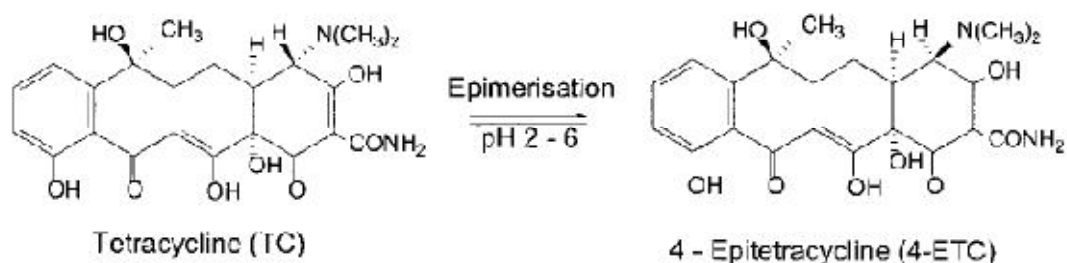


Figure 23: Schéma représentant l'intensité en fonction du temps pour une solution de tétracycline de concentration 1  $\mu\text{g/ml}$

La figure 23 représente l'intensité du signal de détection obtenu par HPLC en fonction du temps pour une solution de tétracycline de concentration 1  $\mu\text{g/l}$ , cette courbe nous servira à titre indicatif. Le pic de tétracycline sort à 4.3 min, précédé par un pic d'épitétracycline isomère. Les tétracyclines se dégradent en 4-épitétracycline [92], cette dégradation ou

encore ce métabolisme peut se produire en solution aqueuse dans les matrices biologiques, il varie notamment en fonction du pH=2-6 [93] et de la température du milieu. L'origine de cet isomère pourrait aussi être métabolique. Les tétracyclines et leurs isomères ont la même masse molaire, la même composition chimique, une seule différence les distingue l'un de l'autre, c'est l'orientation du  $-N(CH_3)_2$  (Figure 24).

Dans notre cas, et en faisant l'analyse de tous nos chromatogrammes pour les NIP et pour les MIP, on voit bien le pic d'épitétracycline qui précède le pic de tétracycline.



«Source de [93]»

Figure 24: Schéma de dégradation de la tétracycline au 4-épitétracycline



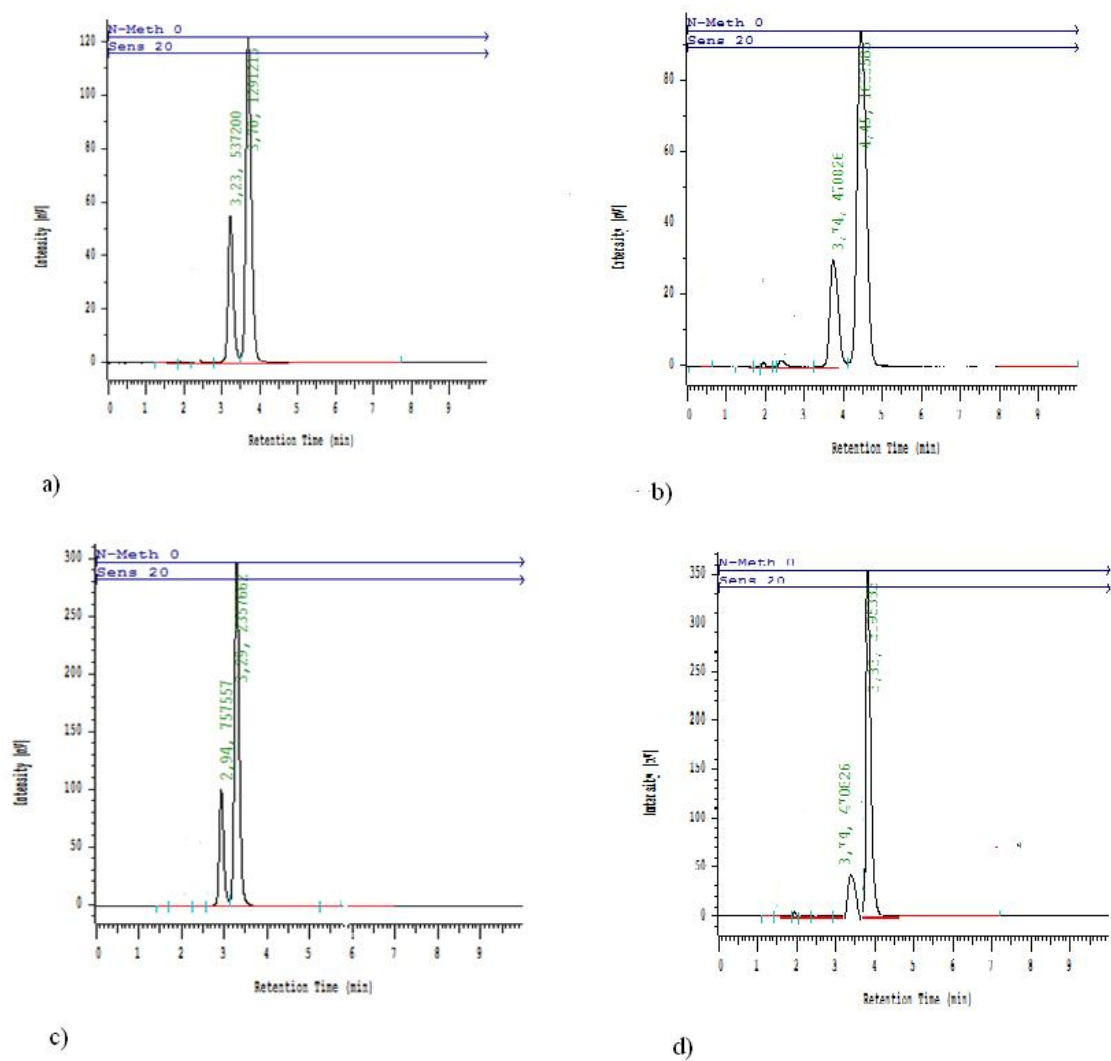


Figure 25 : Schémas représentant l'intensité en fonction du temps de TC pour les quatre lots de MIP de composition : a) 1/2 PLA0H- 1/4 PLACOOH- 1/4 PLAPh, b) 1/4 PLA0H- 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAPh, c) 1/4 PLA0H- 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAPh et d) 1/6 PLA0H- 1/6 PLACOOH- 2/3 PLAPh après une incubation de 24 h

Et pour avoir une confirmation sur la spécificité des sites d'interactions, les NIP subiront les mêmes conditions (incubation pendant 24 h, lavage, test HPLC). Un prélèvement a été récupéré après 24 h d'incubation dans la même solution de tétracycline. La (Figure 26) en représente le résultat.

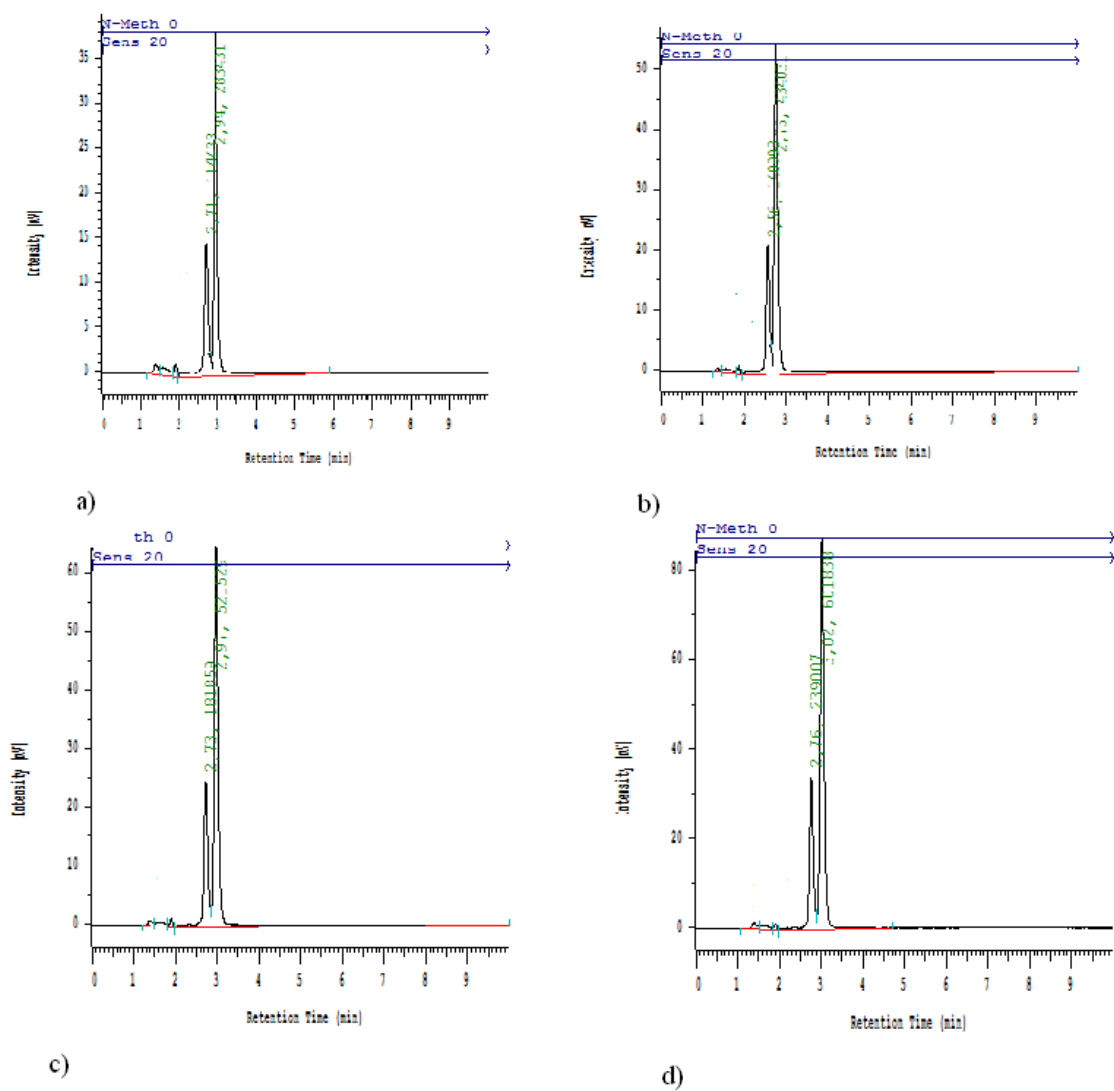


Figure 26 : Schémas représentant l'intensité en fonction du temps de TC pour les quatre lots de NIP de compositions : a) 1/2 PLA<sub>OH</sub>- 1/4 PLACOOH- 1/4 PLAPh, b) 1/4 PLA<sub>OH</sub>- 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAPh, c) 1/4 PLA<sub>OH</sub>- 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAPh et d) 1/6 PLA<sub>OH</sub>- 1/6 PLACOOH- 2/3 PLAPh après une incubation de 24 h

La figure 25a représente l'intensité en fonction du temps de TC pour une composition de 1/2 PLAOH- 1/4 PLACOOH- 1/4 PLAPh après une incubation de 24 h de 200 mg de MIP de tétracycline, avec 20 ml de la solution de tétracycline à 1 µg/l, le pic de tétracycline sort à 3,9 min, et tous calculs faits, le taux de rétention de tétracycline est d'approximativement 38,93 %. On peut observer une différence entre le taux de rétention de MIP en comparaison avec les NIP (Figure 26a). Tous calculs faits, on trouve un taux de rétention dans les NIP égale à 8,47 %.

La figure 25b qui représente l'intensité en fonction du temps de TC pour une composition de 1/2 PLAOH- 1/4 PLACOOH- 1/4 PLAPh après une incubation de 24 h de 200 mg de MIP de tétracycline, avec 20 ml de la solution de tétracycline à 10 µg/l, montre que le pic de tétracycline sort à 4,5 min, et tous calculs faits, le taux de rétention de tétracycline est d'approximativement 44,81 %. On peut observer une différence entre le taux de rétention de MIP en comparaison avec les NIP (Figure 26b). Tous calculs faits, on trouve un taux de rétention dans les NIP égale à 12,24 %.

Ainsi on a laissé intacte la masse de PLAPh, on a augmenté la masse de PLACOOH à 1/2 et on a diminué la masse de PLAOH, le pourcentage de rétention de tétracycline varie légèrement.

La figure 25c qui représente l'intensité en fonction du temps de TC pour une composition de 1/4 PLAOH- 1/4 PLACOOH- 1/2 PLAPh après une incubation de 24 h de 200 mg de MIP de tétracycline, avec 20 ml de la solution de tétracycline à 10 µg/l, montre que le pic de tétracycline sort à 3,5 min, et tous calculs faits, le taux de rétention de tétracycline est d'approximativement 66,34 %. On peut observer une différence entre le taux de rétention de MIP en comparaison avec les NIP (Figure 26c). Tous calculs faits, on trouve un taux de rétention dans les NIP égale à 14,97 %.

Donc on a laissé égale la masse de PLAOH et de PLACOOH, et on a augmenté la masse de PLAPh à 1/2, de même que pour les lots précédents le pourcentage de rétention de tétracycline varie légèrement il était de 8,47 %, après 12,24 % et pour le dernier 14,97 %.

La figure 25d qui représente l'intensité en fonction du temps de TC pour une composition de 1/6 PLA<sub>OH</sub>- 1/6 PLACOOH- 2/3 PLAPh après une incubation de 24 h de 200 mg de MIP de tétracycline, avec 20 ml de la solution de tétracycline à 10 µg/l, montre que le pic de tétracycline sort à 4,3 min, et tous calculs faits, le taux de rétention de tétracycline est d'approximativement 78,07 %. On peut observer une différence entre le taux de rétention de MIP en comparaison avec les NIP (Figure 26d). Tous calculs faits, on trouve un taux de rétention égale à 17,90 %.

Donc on a laissé la même masse de PLA<sub>OH</sub> et de PLACOOH, et on a augmenté la masse de PLAPh à 2/3, de même que pour les lots précédents le pourcentage de rétention de tétracycline varie légèrement il était de 8,47 %, après 12,24 %, 14,97% et pour ce dernier lot le pourcentage de rétention de NIP est de 17,90 %.

On pourra alors conclure qu'avec les quatre lots de MIP, le pourcentage de rétention est passé de 38,93 % à 78,07 % grâce à l'augmentation de la masse du PLAPh, (du groupement de phényle) ce qui confirme notre hypothèse. Ainsi, on peut dire comme première conclusion que la présence du groupement de phényle qui est un groupement aromatique pourrait interagir avec le cycle aromatique de la tétracycline par des liaisons  $\pi$ - $\pi$  et augmenter le nombre de sites d'interactions entre empreinte et tétracycline. La tétracycline serait donc liée au PLA<sub>OH</sub> avec des liaisons hydrogènes, au PLACOOH avec des liaisons électrostatiques et au PLAPh avec des liaisons  $\pi$ - $\pi$  (Figure 27), la (Figure 28) représente l'empreinte formée par un nuage polymérique de nos trois polymères.

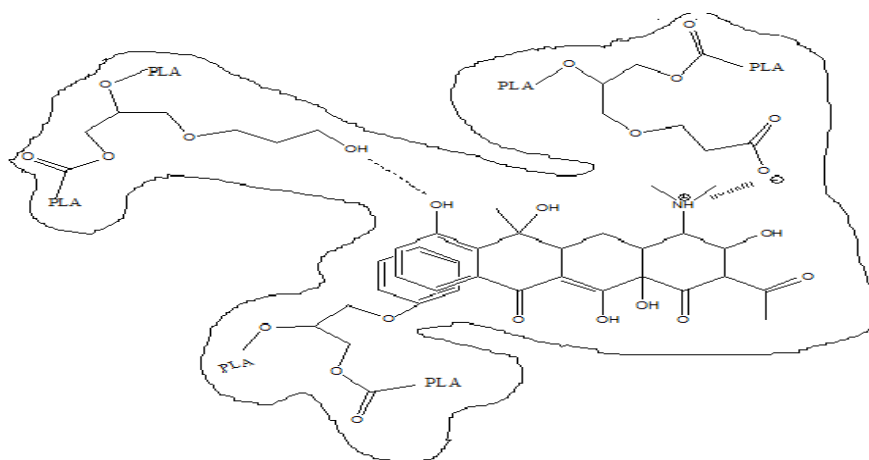


Figure 27: Mécanisme des liaisons entre l'antibiotique et le PLA<sub>OH</sub>-PLA<sub>COOH</sub>-PLA<sub>Ph</sub>

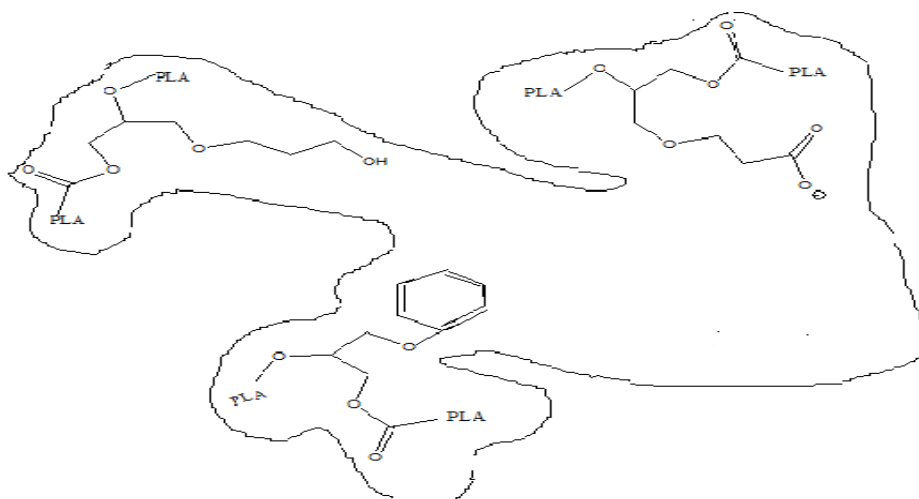


Figure 28: Illustration du nuage polymérique attendu pour la tétracycline

Dans la tétracycline on trouve autre que le cycle aromatique, et les trois autres cycles, des fonctions hydroxyles et un groupement amine tertiaire, ce qui justifie notre utilisation des groupements carboxyliques et hydroxyles du polymère qui peuvent former des liaisons hydrogène avec les groupements acides fonctionnels des tétracyclines. Ainsi, nos résultats,

montrent donc qu'avec des variations des masses de PLAOH et de PLACOOH, le pourcentage de rétention de tétracycline est inférieur à 45 %, ce qui valide encore notre première conclusion.

## VI. Comparaison entre NIP et MIP de tétracycline

Ce schéma est obtenu après injection de nos lots de MIP et de NIP sur HPLC.

Le HPLC nous donne l'aire de surface des pics de tétracycline en fonction du temps de rétention de tétracycline.

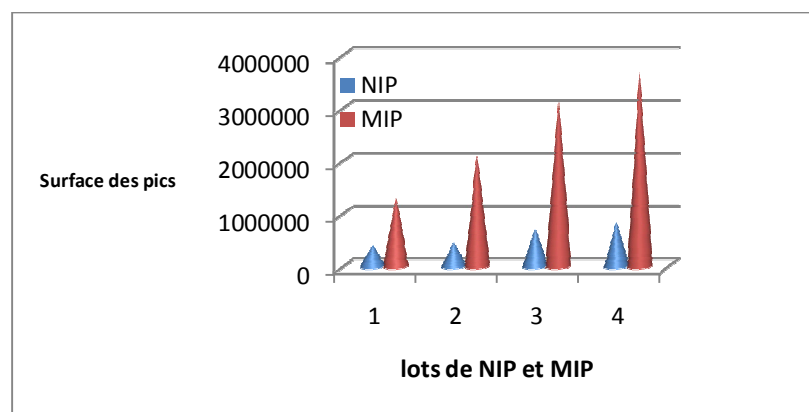


Figure 29: Comparaison entre les aires des pics de tétracyclines obtenues avec les MIP (série 2), et les NIP (série1)

Lot 1 de MIP ou NIP de composition: 1/2 PLAOH- 1/4 PLACOOH- 1/4 PLAPh

Lot 2 de MIP ou NIP de composition: 1/4 PLAOH- 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAPh

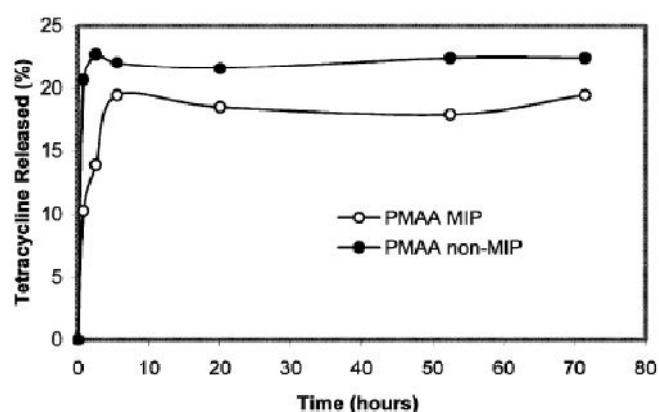
Lot 3 de MIP ou NIP de composition: 1/4 PLAOH- 1/4 PLACOOH- 1/2 PLAPh

Lot 4 de MIP ou NIP de composition: 1/6 PLAOH- 1/6 PLACOOH- 2/3 PLAPh

La figure 29 représente un diagramme qui justifie la spécificité des sites d'interactions des MIP de tétracycline. Ce schéma montre que :

- 1- La quantité de tétracycline retenue par les MIP est largement supérieure à celle retenue par les NIP, étant donné que la surface de l'aire du pic est proportionnelle à la quantité de tétracycline).
- 2- En faisant varier la concentration du PLAPh dans les lots de 1 à 4, la quantité de tétracycline dans les MIP varie remarquablement, ce qui n'est pas le cas avec les NIP, d'où la spécificité de nos MIP.

Ces résultats sont en parfaite concordance avec les résultats mentionnés dans une autre étude qui a travaillé sur le même sujet, c'est-à-dire des MIP de tétracycline mais en utilisant la méthode de synthèse de MIP la plus répandue qui emploie comme monomère l'acide méthacrylique et comme réticulant le diméthacrylate éthylène glycol dont les résultats figurent dans le schéma suivant [94] :



«Source de [94]»

Figure 30 : la libération de tétracycline à travers les MIP et non-MIP

La figure 30 montre bien que :

- 1- La tétracycline serait libérée à travers les deux matrices de MIP et non-MIP.
- 2- La libération de la tétracycline à partir des MIP est plus lente que celle des non-MIP.



- 3- Au début la libération de la tétracycline à partir des non-MIP est presque deux fois plus vite que celle des MIP à raison de la liaison attractive entre la tétracycline et les MIP.

## Conclusion

Les antibiotiques sont utilisés couramment en agriculture et en médecine vétérinaire depuis les années 1950. Leurs utilisations inappropriées, laissent des résidus soit dans les tissus, soit dans les produits laitiers. Ces résidus ont des effets toxiques directs sur les consommateurs, par exemple, des réactions allergiques chez les personnes hypersensibles, ou indirectement et peut même causer des problèmes par le biais de l'induction de souches résistantes de bactéries.

Les pays de l'union européenne ainsi que la FDA, ont strictement réglementé l'utilisation de médicaments vétérinaires pour les espèces animales. Certains de ces médicaments peuvent être autorisés, mais dans des circonstances spécifiques, et en vertu d'une assez faible dose, pour ceux, l'Union-Européenne et la FDA ont fixé des LMR pour plusieurs antibiotiques dans les tissus, le lait et les œufs. Afin de détecter de tels résidus dans les aliments et les tissus, des essais biotechniques sont utilisés comme méthodes de dépistages.

En conséquence, l'élaboration d'une méthode, quantitative ou semi-quantitative, simple, rapide, sensible, efficace et non coûteuse, pour la détermination de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments est vivement souhaitée. Pour des raisons de sécurité alimentaire divers méthodes d'analyse ont été développés.

Une approche plutôt prometteuse dans ce domaine est l'utilisation de polymères à empreinte moléculaires (MIP), qui possèdent la capacité de reconnaître sélectivement un analyte, comme un marqueur biologique, ou autre, en présence d'autres molécules de structure similaire. D'abord utilisés pour la séparation de petites molécules chirales, dans des colonnes de chromatographie, les MIP ont récemment été utilisés dans le domaine biomédical.

Dans ce travail, on a fabriqué des MIP de tétracycline. Les tétracyclines sont parmi les antibiotiques les plus utilisés, se sont des composés antibactériens à large spectre d'activité contre les bactéries à gram-positives et à gram-négatives. Ils sont activement transportés

dans les cellules des bactéries sensibles et peuvent exercer un effet bactériostatique par l'inhibition de la biosynthèse des protéines. Les tétracyclines sont largement utilisées comme médicament en thérapie vétérinaire dans l'élevage de bovins pour la prévention et le traitement de maladie et comme additif dans l'alimentation.

Par conséquence, des résidus de tétracyclines vont se trouver dans le lait des bovins et des vaches, il faut alors trouver un moyen efficace de détection d'antibiotique au pied de la vache.

Dans notre laboratoire on a réussi à fabriquer quatre lots de MIP de tétracyclines, qui ont donné des pourcentages de rétention de 38.93 % pour une composition de 1/4 PLA<sub>OH</sub>- 1/2 PLACOOH- 1/4 PLAOPh, de 44.81 % pour une composition de 1/4 PLACOOH- 1/2 PLA<sub>OH</sub>- 1/4 PLAOPh, de 66.34 % pour une composition de 1/4 PLA<sub>OH</sub>- 1/4 PLACOOH- 1/2 PLAOPh et de 78.07 % pour une composition de 1/6 PLA<sub>OH</sub>- 1/6 PLACOOH- 2/3 PLAOPh.

Ceux qui confirment nos hypothèses qui étaient :

- ☐ Augmenter la portion de PLAPh dans nos quatre lots de MIP augmentera-t-elle le nombre de site d'interaction spécifique avec la tétracycline.
- ☐ Cette même augmentation aurait elle une conséquence directe sur le pourcentage de rétention de la tétracycline à travers les MIP.

Dans un projet futur on pense, dans un premier volet à faire varier la masse de tétracycline, ou encore essayer avec d'autres antibiotiques, un autre volet très intéressant c'est d'essayer de greffer d'autres groupements, à notre PLA, dans le but d'améliorer notre pourcentage de rétention à travers les MIP.

## Bibliographie

1. Victoria Samanidou, S.N., *Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in milk*. Journal of Separation Science, 2008. **31**(11): p. 2068-2090.
2. Bogialli, S., et al., *Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2005. **1067**(1-2): p. 93-100.
3. Kishida, K., *Restricted-access media liquid chromatography for determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their N4-acetyl metabolites in eggs*. Food Chemistry, 2007. **101**(1): p. 281-285.
4. Rubies, A., et al., *Validation of a method for the analysis of quinolones residues in bovine muscle by liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry detection*. Talanta, 2007. **72**(1): p. 269-276.
5. Schenck, F.J. and P.S. Callery, *Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk*. Journal of Chromatography A, 1998. **812**(1-2): p. 99-109.
6. Malintan, N.T. and M.A. Mohd, *Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2006. **1127**(1-2): p. 154-160.
7. Eleni A. Christodoulou, V.F.S.I.N.P., *Development and validation of an HPLC confirmatory method for residue analysis of ten quinolones in tissues of various food-producing animals, according to the European Union Decision 2002/657/EC*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(16): p. 2676-2686.
8. Huang, X., D. Yuan, and B. Huang, *Simple and rapid determination of sulfonamides in milk using Ether-type column liquid chromatography*. Talanta, 2007. **72**(4): p. 1298-1301.
9. He, J., et al., *Molecularly Imprinted Polymer Online Solid-Phase Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography&#x2212;UV for the Determination of Three Sulfonamides in Pork and Chicken*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(9): p. 2919-2925.
10. Samanidou, V.F., E.P. Tolika, and I.N. Papadoyannis, *Development and Validation of an HPLC Confirmatory Method for the Residue Analysis of Four Sulphonamides in Cow's Milk According to the European Union Decision 2002/657/EC*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2008. **31**(9): p. 1358 - 1372.
11. Wang, Z.-H., et al., *Analysis of Sulfamethazine by Fluorescence Polarization Immunoassay*. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007. **35**(6): p. 819-824.
12. Sara, B., et al., *A simple and rapid confirmatory assay for analyzing antibiotic residues of the macrolide class and lincomycin in bovine milk and yoghurt: hot*

- water extraction followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007. **21**(2): p. 237-246.
13. Chopra, I. and M. Roberts, *Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2001. **65**(2): p. 232-260.
  14. Victoria F. Samanidou, K.I.N.I.N.P., *Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of tetracycline antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC*. *Journal of Separation Science*, 2005. **28**(17): p. 2247-2258.
  15. speranza, e.s., *effet de la 2-pyruooldone sur les parametres pharmacocinétiques de l'oxytetracycline administree par voie intraveineuse chez le mouton*. 2001, uiversité paul-sabatier de toulouse.
  16. Tjørnelund, J. and S.H. Hansen, *Determination of impurities in tetracycline hydrochloride by non-aqueous capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 1996. **737**(2): p. 291-300.
  17. Schwarz, S., C. Kehrenberg, and T.R. Walsh, *Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2001. **17**(6): p. 431-437.
  18. Lee, J.-B., et al., *Development of an analytical protocol for detecting antibiotic residues in various foods*. *Food Chemistry*, 2007. **105**(4): p. 1726-1731.
  19. Sarmah, A.K., M.T. Meyer, and A.B.A. Boxall, *A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment*. *Chemosphere*, 2006. **65**(5): p. 725-759.
  20. Fritz, J.W. and Y. Zuo, *Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography*. *Food Chemistry*, 2007. **105**(3): p. 1297-1301.
  21. Haller, M.Y., et al., *Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2002. **952**(1-2): p. 111-120.
  22. E. S. Mitema, G.M.K.H.C.W.K.S., *An assessment of antimicrobial consumption in food producing animals in Kenya*. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics*, 2001. **24**(6): p. 385-390.
  23. Aust, M.-O., et al., *Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle*. *Environmental Pollution*, 2008. **156**(3): p. 1243-1251.
  24. Alexander, T.W., et al., *Farm-to-fork characterization of Escherichia coli associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use*. *International Journal of Food Microbiology*. **137**(1): p. 40-48.
  25. Wang, J., D. Leung, and S.P. Lenz, *Determination of Five Macrolide Antibiotic Residues in Raw Milk Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. **54**(8): p. 2873-2880.

26. Inglis, G.D., et al., *Effects of Subtherapeutic Administration of Antimicrobial Agents to Beef Cattle on the Prevalence of Antimicrobial Resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter hyointestinalis*. Appl. Environ. Microbiol., 2005. **71**(7): p. 3872-3881.
27. Samanidou, V.F., K.I. Nikolaidou, and I.N. Papadoyannis, *Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC*. J Sep Sci, 2007. **30**(15): p. 2430-9.
28. Segura, P.A., et al., *High-Throughput Quantitation of Seven Sulfonamide Residues in Dairy Milk using Laser Diode Thermal Desorption-Negative Mode Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **58**(3): p. 1442-1446.
29. zouaoui, h., *polymères à empreinte moléculaire pour la détection rapide des résidus de tétracycline dans le lait*, in *faculté de pharmacie*, UDEM.
30. Zeng, S.S., E.N. Escobar, and I. Brown-Crowder, *Evaluation of screening tests for detection of antibiotic residues in goat milk*. Small Ruminant Research, 1996. **21**(2): p. 155-160.
31. Furusawa, N., *Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent*. Talanta, 2003. **59**(1): p. 155-159.
32. Chris, M.L., C. Luke, and A.V. Dietrich, *Rapid analysis of tetracycline antibiotics by combined solid phase microextraction/high performance liquid chromatography/mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1999. **13**(17): p. 1744-1754.
33. Barker, S.A. and C.C. Walker, *Chromatographic methods for tetracycline analysis in foods*. Journal of Chromatography A, 1992. **624**(1-2): p. 195-209.
34. Mackie, R.I., et al., *Tetracycline Residues and Tetracycline Resistance Genes in Groundwater Impacted by Swine Production Facilities*. Animal Biotechnology, 2006. **17**(2): p. 157 - 176.
35. De Ruyck, H., et al., *Validation of HPLC method of analysis of tetracycline residues in eggs and broiler meat and its application to a feeding trial*. Food Additives & Contaminants, 1999. **16**(2): p. 47-56.
36. Hendrik De Ruyck, H.D.R., *Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(9): p. 1511-1520.
37. Bogialli, S., et al., *A Rapid Confirmatory Method for Analyzing Tetracycline Antibiotics in Bovine, Swine, and Poultry Muscle Tissues: Matrix Solid-Phase Dispersion with Heated Water as Extractant followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(5): p. 1564-1570.
38. Oka, H., et al., *Improvement of chemical analysis of antibiotics. 18. Identification of residual tetracyclines in bovine tissues by TLC/FABMS with a sample condensation technique*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993. **41**(3): p. 410-415.

39. Moats, W.A., *Determination of Tetracycline Antibiotics in Beef and Pork Tissues Using Ion-Paired Liquid Chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(6): p. 2244-2248.
40. Oka, H., et al., *Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods*. Journal of Chromatography A, 1998. **812**(1-2): p. 309-319.
41. Pena, A., et al., *Validation of an Analytical Methodology for Determination of Oxytetracycline and Tetracycline Residues in Honey by HPLC with Fluorescence Detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(10): p. 3784-3788.
42. Pena, A., et al., *Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Edible Swine Tissues by Liquid Chromatography with Spectrofluorometric Detection and Confirmation by Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(13): p. 4973-4979.
43. Tollefson, L. and B.E. Karp, *Human health impact from antimicrobial use in food animals*. Médecine et Maladies Infectieuses, 2004. **34**(11): p. 514-521.
44. Swartz, Morton A. N., *Human Diseases Caused by Foodborne Pathogens of Animal Origin*. Clinical Infectious Diseases, 2002. **34**(s3): p. S111-S122.
45. *Correspondence*. Analytica Chimica Acta, 1998. **375**(1-2): p. 1-4.
46. Chen, G. and L. Liu, *Hyphenation of Sorbent Extraction and Solid-Matrix Time-Resolved Luminescence Using Tetracycline in Milk as a Model Analyte*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(24): p. 7199-7205.
47. [cited; Available from: [http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c\\_12956/antibiotiques-contre-bacteries?portal=j\\_55&printView=true](http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_12956/antibiotiques-contre-bacteries?portal=j_55&printView=true).
48. Zvirdauskiene, R. and J. Salomskiene, *An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk*. Food Control, 2007. **18**(5): p. 541-547.
49. Jian, W. and L. Daniel, *Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(19): p. 3213-3222.
50. Ramírez, A., et al., *High-performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk*. Journal of Chromatography B, 2003. **784**(2): p. 315-322.
51. de Zayas-Blanco, F., M.S. García-Falcón, and J. Simal-Gándara, *Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatographic separation with ultraviolet detection*. Food Control, 2004. **15**(5): p. 375-378.
52. Lu, H.-T., et al., *Simultaneous Determination of Oxytetracycline, Doxycycline, Tetracycline and Chlortetracycline in Tetracycline Antibiotics by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection*. Chromatographia, 2004. **60**(5): p. 259-264.

53. Santos, S.M., et al., *Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples*. Talanta, 2007. **71**(2): p. 731-737.
54. Shariati, S., Y. Yamini, and A. Esrafil, *Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC-UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(4): p. 393-400.
55. Kurittu, J., et al., *A Group-Specific Microbiological Test for the Detection of Tetracycline Residues in Raw Milk*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(8): p. 3372-3377.
56. Althaus, R.L., et al., *Detection Limits of Antimicrobials in Ewe Milk by Delvotest Photometric Measurements*. J. Dairy Sci., 2003. **86**(2): p. 457-463.
57. Le Breton, M.-H., M.-C. Savoy-Perroud, and J.-M. Diserens, *Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk*. Analytica Chimica Acta, 2007. **586**(1-2): p. 280-283.
58. Sisco, W.M., *Quality Milk and Tests for Antibiotic Residues*. J. Dairy Sci., 1996. **79**(6): p. 1065-1073.
59. Berruga, M.I., et al., *Short Communication: Antibiotic Residues in Milk Following the Use of Intravaginal Sponges for Estrus Synchronization in Dairy Ewes*. J. Dairy Sci., 2008. **91**(10): p. 3917-3921.
60. Boatto, G., et al., *Monitoring of oxytetracycline in ovine milk by high-performance liquid chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999. **20**(1-2): p. 321-326.
61. Schneider, M.J., et al., *Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **846**(1-2): p. 8-13.
62. <http://www.omafra.gov.on.ca/french/livestock/goat/news/dgg0510a4.htm>. octobre 2005 [cited].
63. Federica, B., et al., *An original approach to determining traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2002. **16**(14): p. 1365-1376.
64. Victoria, S. and N. Styliani, *Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in milk*. Journal of Separation Science, 2008. **31**(11): p. 2068-2090.
65. Chung, H.-H., et al., *Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography*. Food Chemistry, 2009. **113**(1): p. 297-301.
66. Cameron Alexander, H.S.A.L.I.A.R.J.A.N.K.I.A.N.J.O.M.M.J.W., *Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003*. Journal of Molecular Recognition, 2006. **19**(2): p. 106-180.
67. Andersson, L.I., *Molecular imprinting for drug bioanalysis: A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay*.



- Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2000. **739**(1): p. 163-173.
68. Ye, L. and K. Mosbach, *Polymers Recognizing Biomolecules Based on a Combination of Molecular Imprinting and Proximity Scintillation: A New Sensor Concept*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(12): p. 2901-2902.
  69. Chapuis, F., V. Pichon, and M.C. Hennion, *Méthode de préconcentration par extraction en phase solide : principe et application aux industries environnementales et pétrolières*. Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP, 2005. **60**(6): p. 899-912.
  70. Ye, L., I. Surugiu, and K. Haupt, *Scintillation Proximity Assay Using Molecularly Imprinted Microspheres*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(5): p. 959-964.
  71. Kandimalla, V. and H. Ju, *Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004. **380**: p. 587-605.
  72. Ramstrom, O., et al., *Food Analyses Using Molecularly Imprinted Polymers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(5): p. 2105-2114.
  73. Andersson, L.I., *Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2000. **745**(1): p. 3-13.
  74. Ersoz, A., et al., *Synergie between molecular imprinted polymer based on solid-phase extraction and quartz crystal microbalance technique for 8-OHdG sensing*. Biosens Bioelectron, 2008. **24**(4): p. 742-7.
  75. <http://www.nascent.qmul.ac.uk/>. [cited.
  76. Ishi-i, T., R. Iguchi, and S. Shinkai, *D/L Selective re-binding of saccharide-imprinted [60]fullerene-bisadducts based on a saccharide-boronic acid interaction: Development of a molecular imprinting technique useful in a homogeneous system*. Tetrahedron, 1999. **55**(13): p. 3883-3892.
  77. Olof, R. and J.A. Richard, *Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future*. Chirality, 1998. **10**(3): p. 195-209.
  78. Trotta, F., et al., *A molecular imprinted membrane for molecular discrimination of tetracycline hydrochloride*. Journal of Membrane Science, 2005. **254**(1-2): p. 13-19.
  79. Guo, Z.-F., T.-T. Guo, and M. Guo, *Preparation of molecularly imprinted adsorptive resin for trapping of ligustrazine from the traditional Chinese herb Ligusticum chuanxiong Hort*. Analytica Chimica Acta, 2008. **612**(2): p. 136-143.
  80. Baggiani, C., L. Anfossi, and C. Giovannoli, *Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers*. Analytica Chimica Acta, 2007. **591**(1): p. 29-39.
  81. <http://www.pharmainfo.net/reviews/synthesis-and-characterization-mips-viable-commercial-venture>. [cited.
  82. Long Yu, H.L.F.X.L.C.X.L., *Effect of annealing and orientation on microstructures and mechanical properties of polylactic acid*. Polymer Engineering & Science, 2008. **48**(4): p. 634-641.

83. Renouf-Glauser, A.C., et al., *The effect of crystallinity on the deformation mechanism and bulk mechanical properties of PLLA*. Biomaterials, 2005. **26**(29): p. 5771-5782.
84. Hofvendahl, K. and B. Hahn-Hägerdal, *-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of Lactobacilli and Lactococci*. Enzyme and Microbial Technology, 1997. **20**(4): p. 301-307.
85. Huda, M.S., et al., *Dynamic mechanical properties of solution-cast poly(-lactide) films*. Materials Science and Engineering A, 2002. **333**(1-2): p. 98-105.
86. Luo, Y., et al., *Synthesis, characterization and biodegradation of butanediamine-grafted poly(dl-lactic acid)*. European Polymer Journal, 2007. **43**(9): p. 3856-3864.
87. Takeshi Semba, K.K.U.S.I.H.H., *The effect of crosslinking on the mechanical properties of polylactic acid/polycaprolactone blends*. Journal of Applied Polymer Science, 2006. **101**(3): p. 1816-1825.
88. Xu, J., et al., *Observation of banded spherulites in pure poly(l-lactide) and its miscible blends with amorphous polymers*. Polymer, 2005. **46**(21): p. 9176-9185.
89. Urayama, H., et al., *Controlled crystal nucleation in the melt-crystallization of poly(-lactide) and poly(-lactide)/poly(-lactide) stereocomplex*. Polymer, 2003. **44**(19): p. 5635-5641.
90. Bittner, B., et al., *Tetracycline-HCl-loaded poly(-lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a spray drying technique: influence of [gamma]-irradiation on radical formation and polymer degradation*. Journal of Controlled Release, 1999. **59**(1): p. 23-32.
91. Nadeau, V., et al., *Synthesis of new versatile functionalized polyesters for biomedical applications*. Polymer, 2005. **46**(25): p. 11263-11272.
92. Anderson, C.R., H.S. Rupp, and W.-H. Wu, *Complexities in tetracycline analysis--chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2005. **1075**(1-2): p. 23-32.
93. Diana, J., et al., *Development and validation of an improved liquid chromatographic method for the analysis of oxytetracycline*. Chromatographia, 2002. **56**(5): p. 313-318.
94. Cai, W. and R.B. Gupta, *Molecularly-imprinted polymers selective for tetracycline binding*. Separation and Purification Technology, 2004. **35**(3): p. 215-221.

**[Tapez ici le titre de l'annexe]**